

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии
развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

На правах рукописи

Риппа Александра Леонидовна

**МОРФОГЕНЕЗ КОЖИ И ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ МУТАНТНЫХ
МЫШЕЙ *we/we* *wal/wal* С ПОСТНАТАЛЬНОЙ АЛОПЕЦИЕЙ**

Специальность 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Е.А. Воротеляк

Москва – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
I.1. Общая характеристика структуры волосяного фолликула.....	10
I.2. Формирование эпидермиса.....	12
I.3. Морфогенез волосяного фолликула.....	14
I.4. Стадии формирования волосяного фолликула.....	15
I.5. Ориентация волосяных фолликулов вдоль передне-задней оси.....	15
I.6. Типы волосяных фолликулов в шерстном покрове мыши.....	17
I.7. Регуляция морфогенеза волосяного фолликула.....	19
<i>I.7.1. Индукция закладки волосяных фолликулов.....</i>	<i>19</i>
<i>I.7.2. Образование и стабилизация плакоды.....</i>	<i>22</i>
<i>I.7.3. Образование дермального компонента волосяных фолликулов.....</i>	<i>25</i>
<i>I.7.4. Пролиферация кератиноцитов и рост волосяных фолликулов.....</i>	<i>26</i>
<i>I.7.5. Дифференциация кератиноцитов волосяных фолликулов.....</i>	<i>28</i>
I.8. Стволовые клетки волосяного фолликула.....	33
I.9. Эпидермальная базальная мембрана.....	35
I.10. Апико-базальная асимметрия базальных кератиноцитов.....	40
I.11. Интегрины в формировании и гомеостазе эпидермиса и волосяных фолликулов.....	42
I.12. Наследственные патологии волос и их модели у лабораторных животных.....	48
I.13. Мутантные мыши <i>we/we wal/wal</i>	56
II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
II.1. МАТЕРИАЛЫ.....	57
<i>II.1.1. Лабораторные животные.....</i>	<i>57</i>
<i>II.1.2. Лабораторное оборудование.....</i>	<i>57</i>
<i>II.1.3. Химические реактивы.....</i>	<i>57</i>
II.2. МЕТОДЫ.....	59

II.2.1. Определение типов волос.....	59
II.2.2. Датирование беременности у мыши.....	59
II.2.3. Забор материала.....	59
II.2.4. Криоблоки.....	59
II.2.5. Иммуногистохимическое исследование.....	60
II.2.6. Выявление активности щелочной фосфатазы.....	61
II.2.7. Гистологическое исследование.....	61
II.2.8. Тотальный препарат эмбрионального эпидермиса.....	61
II.2.9. Фиксация тотального эпидермиса для световой микроскопии.....	62
II.2.10. Тотальный препарат постнатального эпидермиса хвоста.....	62
II.2.11. Выделение культуры первичных эмбриональных кератиноцитов мыши.....	62
II.2.12. Культивирование первичных эмбриональных базальных кератиноцитов мыши.....	63
II.2.13. Индукция дифференциации кератиноцитов в культуре.....	63
II.2.14. Проточная цитофлуориметрия.....	63
II.2.15. Выявление метки BrdU в культуре кератиноцитов.....	64
II.2.16. Инъекция BrdU новорожденным мышам и выявление метки в тотальном препарате эпидермиса.....	64
II.2.17. Модель заживления кожной раны.....	64
II.2.18. Индукция стадии роста волосяных фолликулов с помощью депиляции.....	65
II.2.19. Статистическая обработка результатов.....	65
III РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
III.1. Фенотип шерстного покрова постнатальных мышей <i>we/we wal/wal</i>	67
III.1.1. Общая характеристика шерстного покрова.....	67
III.1.2. Структура стержней волос.....	69
III.2. Стволовые клетки волосяных фолликулов мышей <i>we/we wal/wal</i>	71
III.2.1. Выявление стволовых клеток волосяных фолликулов, длительно сохраняющих метку ДНК.....	71
III.2.2. Экспрессия кератина 15, маркера стволовых клеток волосяных фолликулов....	72
III.3. Регенерация кожи и волосяных фолликулов мышей <i>we/we wal/wal</i>	74
III.3.1. Индукция роста волосяных фолликулов.....	74
III.3.2. Заживление кожной раны у взрослых особей <i>we/we wal/wal</i>	77
III.4. Паттерн распределения и параметры волосяных фолликулов в эмбриональном эпидермисе мышей <i>we/we wal/wal</i> на E18.5.....	80
III.4.1. Количество зачатков волосяных фолликулов и плотность их распределения....	80
III.4.2. Параметры волосяных фолликулов: высота и ширина в основании.....	82

III.5. Формирование эпителиального и мезенхимного компонента волосяных фолликулов эмбрионов E18.5 мышей <i>we/we wal/wal</i>	84
III.5.1. Утолщения базального слоя у эмбрионов <i>we/we wal/wal</i>	84
III.5.2. Утолщения базального слоя – аномальные плакоды мутантных волосяных фолликулов.....	87
III.5.3. Реализация сигнального пути WNT в деформированных мутантных зачатках волосяных фолликулов.....	89
III.5.4. Характер образования дермального компонента мутантных волосяных фолликулов.....	91
III.6. Дифференциация эпидермиса эмбрионов E18.5 мышей <i>we/we wal/wal</i>	94
III.6.1. Пролиферация супрабазальных кератиноцитов <i>we/we wal/wal</i>	94
III.6.2. Аномалии базальной мембраны эмбриональной кожи мутантов.....	96
III.6.3. Стратификация и ороговение эмбрионального эпидермиса <i>we/we wal/wal</i>	98
III.7. Пролиферация и дифференциация эмбриональных кератиноцитов мышей <i>we/we wal/wal</i> в условиях <i>in vitro</i>	102
III.7.1. Пролиферация в культуре первичных кератиноцитов.....	102
III.7.2. Доля клеток в фазе S клеточного цикла.....	103
III.7.3. Распределение кератиноцитов по фазам клеточного цикла.....	104
III.7.4. Индукция дифференциации культуры первичных кератиноцитов.....	105
III.8. Образование клеток-предшественников стержня волоса у эмбрионов E18.5 мышей <i>we/we wal/wal</i>	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЖ – балдж, область локализации стволовых клеток волосяного фолликула

БМ – базальная мембрана

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВФ – волосяной фолликул

ДК – дермальный конденсат

ДП – дермальная папилла

К – кератин

ППК – планарная поляризация клеток

ПФА – параформальдегид

СК – стволовая клетка

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

BMP – белок морфогенеза кости (bone morphogenesis protein)

BrdU –бромдезоксимуридин (bromodeoxyuridine)

CTGF – фактор роста соединительной ткани (connective tissue growth factor)

DAB – 3,3'- диаминобензидин, субстрат пероксидазы хрена (3,3'-diaminobenzidine)

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium)

DPBS – фосфатно-солевой буфер в модификации Дюльбекко (Dulbecco's phosphate-buffered saline)

Е – день эмбрионального развития (embryonic day)

EDA – эктодисплазин (ectodysplasin-A)

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)

FGF – фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor)

LEF1 – лимфоидно-усиливающий фактор 1 (lymphoid enhancer-binding factor 1)

NF-κB – ядерный фактор «каппа-би» (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

P – день постнатального развития (postnatal day)

PDGF – фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor)

PI – йодид пропидия (propidium iodide)

TGFβ – трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor beta)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Биология кожи и ее придатков интенсивно изучается уже многие годы. Эти исследования дали обширные и интересные результаты, раскрывающие механизмы многих процессов, имеющих общебиологическое значение. Среди них регуляция клеточной пролиферации и дифференцировки, стволовые клетки (СК) и их ниши, поддержание «стволового» статуса и выход из ниши, эпителио-мезенхимные взаимодействия, морфогенез и регенерация (Fuchs, Nowak, 2008; Blanpain, Fuchs, 2009; Schneider et al., 2009; Sennett, Rendl, 2012; Eckert et al., 2013; Kulukian, Fuchs, 2013; Vorotelyak et al., 2013). Исследования в этой области имеют также и несомненный практический интерес: известно несколько сот заболеваний кожи, волос и кожных желез (Shimomura, Christiano, 2010; Shimomura 2012).

В «науке о коже» (Investigative Dermatology) особо выделяется область, связанная с биологией волосяного фолликула (ВФ). Этот небольшого размера орган, способный к органотипической регенерации, представляет собой значимую модель для биологии развития, клеточной биологии, а в последнее время и для исследований в области эпигенетики (Botchkarev et al., 2012; Mardaryev et al., 2014). Кроме того, все большее распространение у человека приобретают патологии волос и растет спрос на их излечение. Среди этих патологий наибольшее социальное значение имеет алопеция – облысение.

Одним из подходов исследования механизмов облысения и других патологий кожи является использование модельных лабораторных животных. Наследственные заболевания волос у человека были описаны во многом благодаря изучению мышинных моделей с аналогичными заболеваниями. Накопленные данные отчетливо демонстрируют, что характер роста волос у людей и у мышей имеет большое сходство (Blume-Peytavi et al., 2008). В мировых коллекциях содержатся десятки лабораторных животных, в основном мыши со спонтанными мутациями или модифицированные с помощью генных технологий имеющих так называемый «кожный фенотип», т.е. те или иные нарушения структуры и функции кожи и ВФ шерстного покрова. Имеются опубликованные таблицы, кратко описывающие характер и генную основу этих аномалий, если она известна (Nakamura et al., 2001, 2013). Как правило, трансгенные животные были получены в ходе конкретных научно-исследовательских работ и хорошо описаны. С другой стороны, для многих спонтанных мутаций подробное описание их фенотипа отсутствует. Это связано, как правило, с тем, что эти мутации были получены довольно давно, в то время как общепринятые в настоящее время высокоинформативные процедуры описания «кожного фенотипа» разработаны, в основном, за последнее десятилетие в связи с бурным накоплением информации в области биологии ВФ. В частности, в подробностях был изучен

морфогенез ВФ в эмбриональном развитии мыши, механизмы, реализующиеся на разных стадиях этого процесса и белки-маркеры, экспрессирующиеся в это время (Schmidt-Ullrich, Paus, 2005; Schneider et al., 2009; Sennett, Rendl, 2012; Lee, Tumbbar, 2012). Все это позволяет весьма точно описывать нарушения морфогенеза ВФ, если таковые имеются. Поскольку механизмы, отвечающие за развитие фолликула в эмбриогенезе и в цикле постнатальной регенерации, весьма сходны, следует ожидать, что у животных, страдающих алопецией, с высокой вероятностью можно обнаружить аномалии морфогенеза ВФ в эмбриогенезе. По нашему мнению, характеристика эмбрионального развития кожи позволяет наиболее точно сформулировать причины врожденной алопеции и пополнить представления о причинах других типов алопеции.

Среди спонтанных мутаций, перечисленных в опубликованных таблицах (Sundberg, King, 1996; Nakamura et al., 2001), имеются мутации *we* и *wal*. В Институте общей генетики РАН содержались животные с данными мутациями. Мыши *we/we* имеют волнистый шерстный покров (Hertwig, 1942), у мышей *wal/wal* тоже волнистые волосы, но со временем развивается частичное облысение, что приводит к разрежению шерстного покрова (Sorokina, Blandova, 1985). Конюхов Б.В. и коллеги получили и исследовали линию мышей *we/we wal/wal*, несущую одновременно две мутации. Было обнаружено, что двойные гомозиготы *we/we wal/wal* лысеют к 21 дню после рождения (Конюхов и др., 2004). В работе Нестеровой А.П. под руководством Конюхова Б.В. была определена продолжительность циклов роста волос у этих мутантов (Нестерова 2010; Нестерова и др., 2012). Подробного описания фенотипа и, тем более, исследования эмбрионального морфогенеза сделано не было.

Среди задач нашей работы было подробное описание кожного фенотипа и некоторых особенностей гомеостаза кожи мутантных мышей в постнатальном периоде. В частности, мы исследовали структуру шерстного покрова, характер заживления кожной раны для определения регенеративной способности эпидермиса и потенциала СК ВФ, способность ВФ вступать в фазу роста, после принудительной стимуляции. Основное же внимание мы уделили характеристике морфогенеза ВФ мышей *we/we wal/wal* в эмбриогенезе. Исследования проводили на эмбрионах мышей возраста 18.5 дней (E18.5), так как на этот срок эмбриогенеза в коже мыши обнаруживаются все 3 волны морфогенеза четырех типов ВФ и сформированы все слои эпидермиса.

Целью исследования было сравнительное изучение особенностей постнатального гомеостаза, эмбрионального развития кожи и волосяных фолликулов (ВФ) мутантных мышей генотипа *we/we wal/wal*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать структуру шерстного покрова у мутантов *we/we wal/wal* и выявить стволовые клетки ВФ у взрослых особей.
2. Проанализировать формирование нового шерстного покрова после депиляции волос первой генерации.
3. Сравнить темпы и стадии заживления кожной раны у взрослых особей.
4. Исследовать паттерн распределения и размеры ВФ в эпидермисе у эмбрионов на стадии E18.5.
5. Охарактеризовать профиль экспрессии маркеров эпителиального и мезенхимного компонента ВФ у эмбрионов на стадии E18.5.
6. Охарактеризовать профиль экспрессии маркеров стратифицированного эпидермиса у эмбрионов на стадии E18.5.
7. Исследовать пролиферацию и дифференциацию первичных эмбриональных кератиноцитов *we/we wal/wal in vitro*.

Научная новизна работы.

Впервые проанализированы особенности эмбрионального развития кожи и ее придатков мутантных мышей *we/we wal/wal*. У мутантных эмбрионов обнаружена значительная задержка формирования ВФ. Выявлено нарушение дифференциации клеток, образующих стержень волоса у мутантов, как в эмбриогенезе, так и постнатально. У мутантных эмбрионов обнаружены нарушения формирования дермального компонента ВФ. Впервые показано отсутствие инвагинации и аномалии плакод ВФ мутантных мышей *we/we wal/wal*. Подобное отсутствие инвагинации плакод в литературе описано только для двух других линий мышей (Yi et al. 2006; Zhang et al. 2011). В эмбриональной коже мутантных мышей *we/we wal/wal* наблюдается дисбаланс обмена сигналами между эпидермисом и дермой, что поднимает ключевые вопросы очередности этапов инструктирования двух компартментов кожи (эпителиального и мезенхимного) при образовании ВФ. Впервые изучена локализация СК ВФ у постнатальных мутантов *we/we wal/wal* с алопецией.

Практическая и теоретическая значимость.

В ходе исследования был разработан новый метод изучения эпидермиса с помощью световой микроскопии. Мы впервые применили тотальный препарат эмбрионального эпидермиса спины мыши для изучения и характеристики паттерна ВФ. Данный подход может использоваться для изучения морфометрических параметров ВФ и у других мутантных (трансгенных) мышей с аномальным фенотипом волос и дефектами кожи. Разработанная

методика позволяет оценить количество зачатков ВФ уже в эмбриогенезе и выявить аномалии структуры фолликулов, если таковые имеются.

Мы показали, что причины, ведущие к развитию наследственной алопеции, проявляются еще в период эмбриогенеза при закладке кожи. Это может иметь значение для ранней диагностики, лечения, а также изучения механизмов фенотипического проявления подобных заболеваний. Результаты работы могут быть также использованы для разработки тканеинженерных конструкций для лечения алопеции.

Результаты исследования могут быть использованы для изучения механизмов спецификации клеток дермального компонента и индукции формирования ВФ.

Комплексный подход к изучению морфогенеза ВФ, примененный в настоящем исследовании может быть использован специалистами в области кожи в качестве методического пособия. Результаты нашей работы могут быть использованы в курсе лекций по биологии развития и клеточной биологии. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование мутантных мышей *we/we* *wal/wal* для молекулярно-генетических и эмбриологических исследований.

Апробация диссертации.

Результаты диссертационной работы были представлены на: VIII Международной конференции "Молекулярная генетика соматических клеток" (Звенигород, 2011); Конференции молодых ученых ИБР РАН (Москва, 2012); III съезде общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012); Конференции «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии» (Москва, 2012); XIX и XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2012, 2013); Всероссийской конференции с международным участием "Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция" к 135-летию со дня рождения П.П.Иванова (Санкт-Петербург, 2013); Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК – 3, тезисов докладов и материалов конференций – 8.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 143 страницах, содержит 48 рисунков и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 371 цитируемый источник.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

Кожа млекопитающих – это самый большой орган, состоящий из подкожно-жировой клетчатки, дермы и эпидермиса и выполняющий широкий ряд жизненно-важных функций.

Эпидермальная ткань образована межфолликулярным эпидермисом и эпидермальными придатками, такими как ВФ, сальные и потовые железы, каждый из которых содержит свой пул СК, за счет которых осуществляется гомеостаз и репарация в случае повреждения. Эпидермис отделен от дермы базальной мембраной (БМ), в образование которой вносит вклад как базальный слой эпидермальных клеток, так и фибробласты дермы, непосредственно прилегающие к ней.

Наличие волосяного покрова является одной из характерных черт класса млекопитающих. Волосяной покров выполняет терморегуляционную, защитную, сенсорную и социальную функции. ВФ развивается и функционирует при тесном взаимодействии эпидермальных и дермальных клеток. Эпидермальный компонент ВФ составляют матрикс волоса, наружное корневое влагалище, внутреннее корневое влагалище и стержень волоса. В состав дермального компонента входят дермальная папилла (ДП) и соединительнотканый чехлик. Самый внешний эпителиальный слой ВФ – наружное корневое влагалище. После него следует внутреннее корневое влагалище, которое окружает стержень волоса. В верхней трети

наружного корневого влагалища имеется утолщение – зона балдж (БЖ) (англ. bulge – утолщение, выпуклость), место локализации СК ВФ. Основание ВФ или луковица состоит из специализированных кератиноцитов матрикса и мезенхимных клеток ДП (рис. 1). Стержень волоса образован терминально дифференцированными кератиноцитами (трихоцитами) и является производным ВФ. От периферии к центру стержень волоса состоит из кутикулы (оболочка), формирующей поверхность волоса, кортекса (корковый слой), состоящего из всех

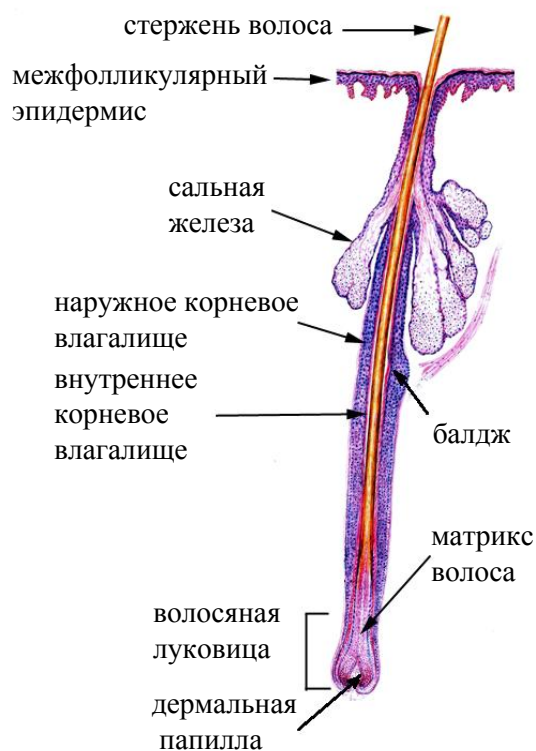


Рисунок 1. Строение волосяного фолликула человека

кератинов волоса, и медуллы (сердцевина или мозговой слой) (рис. 2). Строение коркового и сердцевинного слоев волос млекопитающих, как и кутикулярный орнамент и морфология чешуй, сильно варьирует и используется в качестве диагностического признака для идентификации таксонов и определения видовой специфичности (Чернова, 2003). С ВФ также ассоциированы сальные железы, кровеносные сосуды, нервные окончания и мышца, поднимающая волос, которая прикрепляется к ВФ в зоне БЖ.

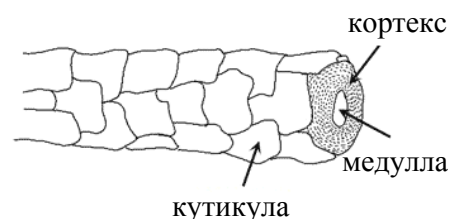


Рисунок 2. Строение стержня волоса.

В постнатальный период жизни верхняя часть ВФ (включая БЖ и сальную железу) и ДП сохраняются, а остальная часть ВФ подвергается циклическим изменениям, которые подразделяются на стадии: анаген (рост), катаген (регрессия) и телоген (покой) (рис. 3). У мыши стадия анагена начинается с морфогенеза ВФ на E14.5 и продолжается в течение 2-х недель после рождения. Затем наступает стадия катагена, которая длится в течение недели, после чего ВФ вступает в стадию телогена, которая имеет такую же продолжительность. Далее ВФ циклирует в таком же ритме (Stenn, Paus, 2001).

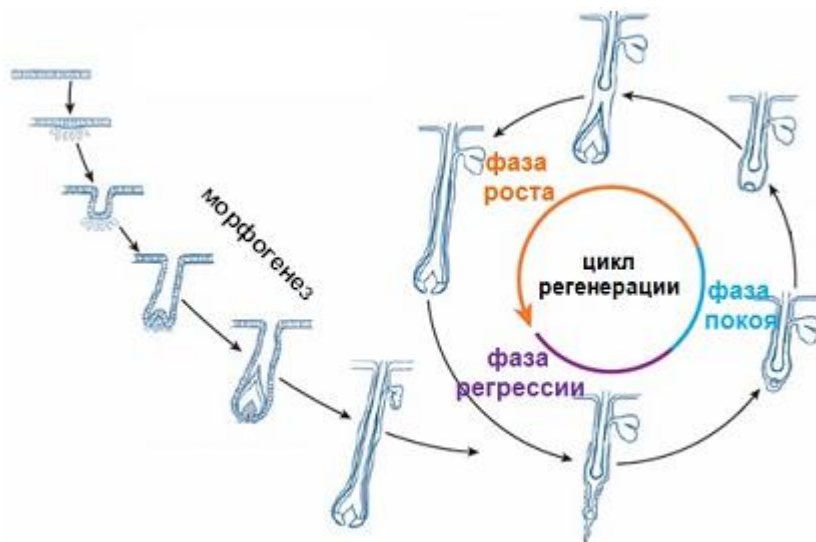


Рисунок 3. Цикл регенерации волосяного фолликула. (по Shimomura, Christiano, 2010 с изменениями)

Продолжительность

анагена ВФ скальпа человека варьирует от 2-х до 7-ми лет, фаза телогена длится около 3-х месяцев, после чего стержень волоса сбрасывается. Каждый ВФ на протяжении жизни в среднем продуцирует 20-30 стержней волос. В норме 95% ВФ скальпа пребывают в фазе анагена и 5% в фазе телогена (Gray, Dawber, 1999).

I.2. ФОРМИРОВАНИЕ ЭПИДЕРМИСА

Формирование эпидермиса в эмбриогенезе мыши начинается с E8.5. Эпидермис образуется из одного слоя эктодермальных клеток – кератиноцитов. Далее кератиноциты эмбрионального базального слоя дают начало второму слою клеток – перидерме. В дальнейшем происходит дифференциация и стратификация эмбрионального эпидермиса. Симметричное деление клеток обеспечивает пополнение популяции базальных кератиноцитов и увеличение площади эпидермиса. Путем асимметричного деления базальных кератиноцитов образуется потомство, комитированное к терминальной дифференцировке и обеспечивающее стратификацию (рис. 4). Перидерма слущивается незадолго до рождения в момент приобретения эпидермисом барьерной функции (барьера в виде ороговения). (Lechler, Fuchs 2005; Koster, Roop 2007; Poulson, Lechler, 2010)

В результате стратификации образуется многослойный эпидермис, состоящий из четырех слоев кератиноцитов. Базальный слой кератиноцитов (экспрессирует цитокератин 5/14), контактирует с БМ и характеризуется высоким пролиферативным потенциалом. Вышележащие слои образованы кератиноцитами на разных стадиях дифференцировки: шиповатый слой (экспрессирует цитокератины 1/10), гранулярный (экспрессирует белки предшественники



Рисунок 4. Строение эпидермиса (по Kulukian, Fuchs, 2013)

ороговения: лорикрин, инволюкрин, филлагрин), и ороговевающий (рис. 4). На E9.5 первыми в эпидермисе экспрессируются цитокератины 5/14 в базальном слое клеток и перидерме, что подтверждает ее появление в результате эпидермальной стратификации. На E13.5 впервые детектируется экспрессия мРНК цитокератинов 1/10. Это событие отражает процесс дифференциации супрабазальных кератиноцитов (Wu et al., 1994). Процесс терминальной дифференциации начинается с выхода базальных кератиноцитов из клеточного цикла и утраты адгезии к БМ. Формирование шиповатого слоя кератиноцитов сопряжено с подавлением экспрессии генов, экспрессирующихся в базальных кератиноцитах; увеличением экспрессии специфических генов, необходимых для клеточной дифференциации; поддержанием статуса шиповатых кератиноцитов и предотвращением их преждевременной дифференциации в гранулярные, регулицией их последовательного перехода в гранулярные кератиноциты.

Важным регулятором дифференциации является транскрипционный фактор *p63*, ген семейства *p53*, экспрессирующийся в базальных клетках всех стратифицированных эпителиев

(Blanpain, Fuchs, 2007). При отсутствии *p63* эпидермис не способен формировать стратифицированный эпителий, а эпидермальные придатки не развиваются (Mills et al., 1999). Аутосомно-доминантные мутации *p63* у человека вызывают развитие различных форм эктодермальной дисплазии, в том числе, эктодактилию и заячью губу. Каждый синдром является результатом мутаций разных доменов *p63*.

Структурно *p63* – это сложный ген, продуктом которого могут быть, по крайней мере, 6 изоформ белка. Для инициации стратификации эпителия необходима экспрессия изоформ *p63*, содержащих трансактивирующий домен ТА (зеленый) в однослойной эктодерме. На более поздних стадиях эпидермального морфогенеза для созревания эпидермиса требуется переключение экспрессии изоформ ТАр63 на изоформы ΔNr63 (красный) (рис. 5).

Когда клетки покидают базальный слой и переходят в супрабазальное положение, они начинают экспрессировать такие «ранние маркеры» дифференцировки, как цитokerатины 1/10 и инволюкрин. По мере перехода в гранулярный слой кератиноциты синтезируют «поздние маркеры»: белки роговой оболочки лорикрин и стабильный инволюкрин, сшитый трансглутаминазой; филагрин, связывающий кератиновые филаменты в макрофибриллы и накапливающийся в виде кератогиалиновых гранул. Белки роговой оболочки синтезируются и накапливаются под плазматической мембраной гранулярных клеток. Когда мембраны клеток становятся проницаемы для ионов кальция, активируется трансглутаминаза, с помощью которой образуется прочная белковая капсула, удерживающая макрофибриллы кератина. На поздних этапах терминальной дифференцировки происходит разрушение органелл и ядер. Мертвые клетки рогового слоя совместно с липидной оболочкой создают непроницаемый барьер и впоследствии сменяются нижележащими клетками, слущиваясь с поверхности эпидермиса.

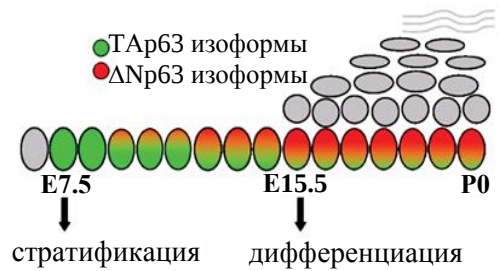


Рисунок 5. Роль изоформ *p63* в развитии эпидермиса (по Koster, Roop, 2004 с изменениями)

1.3. МОРФОГЕНЕЗ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

Морфогенез ВФ у мыши начинается в результате сложных эпителио-мезенхимных взаимодействий. Первыми морфологическими признаками инициации ВФ является образование эпидермальных плакод и клеток дермального конденсата (ДК) в дерме под ними. До настоящего времени нет точных данных о происхождении первичного индуктивного сигнала. Остается неясным, дерма или эпидермис является источником этого сигнала.

Далее эпителиальные зачатки ВФ пролиферируют, инвагируют в дерму, удлиняются и окружают ДК, образуя луковицу фолликула. ДК в составе луковицы уже называется ДП, а образующие его клетки обладают особой пластичностью и потенциями к индукции роста ВФ. Сигналы из ДП определяют специализацию кератиноцитов. Кератиноциты матрикса дифференцируются, образуя внутреннее

корневое влагалище. Наружное корневое влагалище окружает внутреннее корневое влагалище и является продолжением базального слоя эпидермиса. Когда внутреннее корневое влагалище сформировано, кератиноциты матрикса волоса начинают дифференцироваться и формировать различные структуры стержня, который проникает во внутреннее корневое влагалище (рис. 6). В завершении морфогенеза ВФ стержень волоса прорастает наружу. Морфогенез ВФ включает как процессы пролиферации и инвагинации, так и апоптоза, который позволяет избежать излишней пролиферации (Magerl et al., 2001).

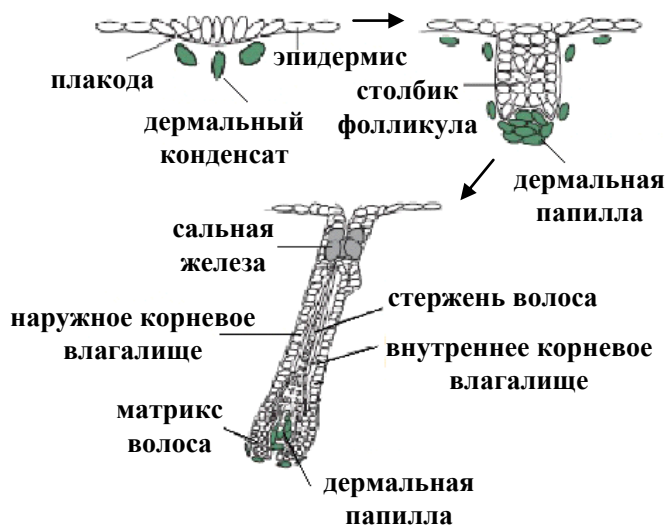


Рисунок 6. Морфогенез волосяного фолликула (по Botchkarev et al., 1999 с изменениями)

I.4. СТАДИИ ФОРМИРОВАНИЯ ВОЛОСЯНОГО Фолликула

В настоящее время в морфогенезе ВФ принято выделять 8 стадий формирования (рис. 7) (Paus et al., 1999).

Стадия 1 – формирование утолщений эпителия в виде плакод и клеток ДК под ними.

Стадия 2 – пролиферация эпителиальных плакод и образование зачатков ВФ (hair germ).

Стадия 3 – концентрическое расположение множества слоев кератиноцитов вдоль оси ВФ (peg stage). Формирование округлой ДП.

Стадия 4 – кератиноциты в основании ВФ окружают ДП удлиненной формы.

Стадия 5 – элонгация ВФ, дифференцировка кератиноцитов внутреннего корневого влагалища. Появление первых себоцитов (bulbous peg).

Стадия 6 – многослойное внутреннее корневое влагалище достигает самой дистальной части ВФ. Становится видимым канал ВФ, который содержит стержень волоса. Себоциты начинают формировать железистую структуру.

Стадия 7 – кончик стержня ВФ покидает внутреннее корневое влагалище.

Стадия 8 – ВФ достигает максимальной длины. Выступающая часть стержня ВФ появляется на поверхности эпидермиса (Paus et al., 1999, Schmidt-Ullrich, Paus, 2005).

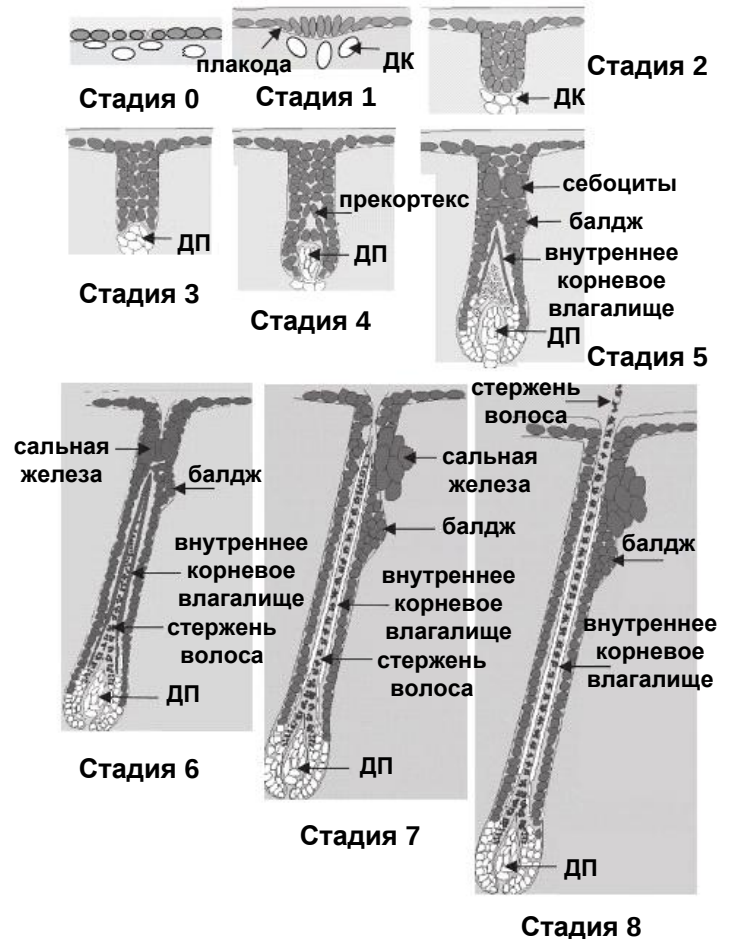


Рисунок 7. Стадии формирования волосяного фолликула (по Paus, 1999 с изменениями)

I.5. ОРИЕНТАЦИЯ ВОЛОСЯНЫХ Фолликулов Вдоль Передне-Задней Оси

Незадолго до закладки ВФ базальные кератиноциты поляризуются в плоскости эпидермиса. Планарную поляризацию клеток (ППК) также называют полярностью ткани, имея в виду поляризованную организацию клеток в плоскости эпителия. Это понятие в первую

очередь сформировано на основе исследований эпителия крыльев и глаз дрозофилы (Gubb, Garcia-Bellido, 1982; Wong, Adler, 1993). Сигнальные механизмы ППК эволюционно консервативны. Формирование и поддержание соответствующей полярности необходимо для различных клеточных функций, таких как определение плоскости веретена деления, направленной передачи молекул, поддержание формы клетки и направленной миграции. В эпителии были тщательно изучены два типа полярности, это ППК (Simons, Mlodzik, 2008; Axelrod, 2009; McNeill, 2010) и апико-базальная полярность (Bryant, Mostov, 2008; McCaffrey, Macara, 2009; Nelson, 2009; St Johnston, Ahringer, 2010).

Установление ППК выражается в поляризованном накоплении белков ППК на противоположных латеральных сторонах клеточной мембраны эпителиальных клеток. Асимметричная локализация различных белков ППК действует как уникальный механизм сигнализации. Однако, поляризованная локализация белков ППК не может регулировать транскрипцию гена непосредственно. Чтобы контролировать морфологию и поведение поляризованных клеток, сигнализации ППК необходимы эффекторные белки (Wedlich, 2002; Wang, Nathans, 2007; Simons, Mlodzik, 2008).

Зачатки ВФ на ранних стадиях развития приобретают передне-заднюю ориентацию (Chen, Chuong, 2012). Направленность ВФ можно различить не только морфологически, по повороту луковичи ВФ в anteriальную сторону, но и по асимметричной экспрессии молекул адгезии: E-кадгерина, P-кадгерина и NCAM. Процесс поляризации клеток в плоскости эпидермиса и глобальная ориентация ВФ осуществляется через неканонический сигнальный путь WNT. У мыши в нем задействованы гены *Fzd3*, *Fzd6*, *Vangl2*, *Celsr1*, *Dvl1*, и *Dvl2*, соответственно гомологичные генам дрозофилы: *Frizzled*, *Strabismus*, *Flamingo* и *Dishevelled*.

Белковые продукты этих генов до начала морфогенеза ВФ на E13.5 асимметрично распределяются в базальных кератиноцитах мыши, поляризуя клетки в плоскости эпидермиса. Но поляризованное состояние клеток закрепляется только начиная с E14.5. Экспериментально было показано, что после двух дней культивирования *ex vivo* эксплантатов кожи мыши от E13.5 и E14.5, поляризация сохранялась только в эксплантатах от E14.5. Как только кератиноциты поляризуются в эпидермальной плоскости, ППК становится необходимой для последующего поляризованного поведения плакод вдоль передне-задней оси. Существует предположение, что ВФ приобретают позиционную информацию от базальных кератиноцитов, которые становятся поляризованными вдоль передне-задней оси, что совпадает по времени с индукцией ВФ. Поляризация в базальном слое эпидермиса развивается раньше закладки ВФ и не зависит от стратификации, спецификации плакоды и роста ВФ (Devenport, Fuchs, 2008).

1.6. ТИПЫ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ В ШЕРСТНОМ ПОКРОВЕ МЫШИ

Шерстный покров мыши состоит из нескольких типов ВФ, которые закладываются в разное время эмбриогенеза. Всего на теле мыши выделяют 8 типов ВФ: вибриссы, ресницы, паховые, ВФ хвоста и 4 типа на спине. Типы ВФ шерстного покрова спины мыши разделяют на 2 группы: первичные тилотриховые остевые ВФ и вторичные нетилотриховые ВФ.

Первыми на E14.5 закладываются остевые ВФ, стержни которых являются самыми длинными и выступают над общим меховым покровом. У взрослой мыши количество первичных ВФ в шерстном покрове составляет около 1-3%. ВФ остевых тилотриховых волос имеют 2 сальные железы; прямой и длинный стержень; двурядную медуллу (рис. 8). Вторичные нетилотриховые ВФ включают шиловидные, пуховые и зиг-заг ВФ. Шиловидные ВФ развиваются на E16.5 во вторую волну морфогенеза ВФ, имеют прямой стержень, достигающий обычно только половину длины стержней остевых тилотриховых ВФ, и двух-трехрядную медуллу. Их количество в шерстном покрове составляет около 30%. Пуховые ВФ закладываются на E16.5 вместе с шиловидными или на E17.5-E18.5. Они напоминают шиловидные ВФ, так как также имеют двух-трехрядную медуллу, но отличаются одним изгибом стержня. Пуховые ВФ представлены в шерстном покрове в наименьшем количестве, до 0,1%. Зиг-заг волосы имеют несколько изгибов и однорядную медуллу. Этот тип волос закладывается на E18.5-P1 в третью волну образования ВФ и является преобладающим – около 70% (рис. 8) (Schlake, 2007; Duverger, Morasso, 2009).

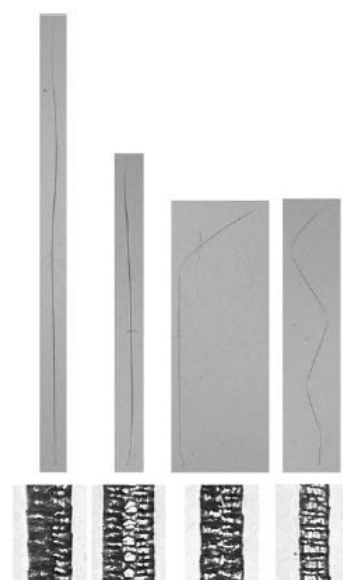


Рисунок 8. Типы волоса-ных фолликулов шерсти мыши (по Duverger, Morasso, 2009; Schlake, 2007 с изменениями)

Характеристика типов волос шерстного покрова мыши (по Duverger, Morasso, 2009 с изменениями).

	остевые	шиловидные	пуховые	зиг-заг
	тилотриховые	нетилотриховые		
время закладки плакоды	E14	E16-17		E18-P1
	первичные плакоды	вторичные плакоды	третичные плакоды	
длина (относительно остевых волос)	1 (около 1 см)	1/2 – 2/3	1/2 – 2/3	1/2 – 2/3
ряды медуллы	2	2–4	2–4	1
число изгибов	0	0	1	3–4
количество	1–3%	30%	0,1%	65–70%

Помимо ВФ шерстного покрова спины, у мыши выделяют ВФ вибрисс и ВФ хвоста. Вибриссы появляются самыми первыми в эмбриогенезе мыши на E12.5 и продуцируют самые длинные стержни волос. Фолликул вибриссы густо иннервирован, снабжен кровеносными сосудами и выполняет важную сенсорную функцию (Schmidt-Ullrich, Paus, 2005). ВФ хвоста мыши закладываются на E16.5 в виде триплетов, центральный фолликул в этой тройке формируется первым. Когда центральный фолликул достигает стадии 3, одновременно образуются два ВФ, справа и слева от него (Frances, Niemann, 2012).

Подавляющее большинство сигнальных путей, описанных в литературе, касаются первой волны развития остевых ВФ и не учитывают другие типы ВФ, которые закладываются в разное время. Однако было показано, что развитие остевых и зиг-заг ВФ значительно зависит от EDA/EDAR сигналинга, отсутствие которого не влияет на развитие вибрисс и шиловидных ВФ спины (Schmidt-Ullrich et al., 2001; Schmidt-Ullrich, Paus, 2005). Другой пример демонстрирует необходимость NOGGIN для формирования стержня волоса тилотриховых ВФ, в отличие от нетилотриховых. Последним он необходим для индукции развития. У *Noggin*-мутантов не формируются вибриссы, шиловидные, пуховые и зиг-заг ВФ (Botchkarev et al., 1999; 2002). Вероятно, несмотря на то, что вибриссы закладываются первыми на теле мыши, до развития ВФ шерстного покрова спины, механизмы, ответственные за развитие вибрисс, скорее схожи с развитием вторичных, а не первичных ВФ спины мыши. Подобным образом дело обстоит и с развитием ВФ хвоста. Так как они закладываются на E16.5, то можно предположить, что за их развитие отвечают механизмы, вовлеченные в закладку вторичных ВФ, также образующихся на E16.5. Но у мутантов по *Eda1* (*Tabby*) развиваются вторичные ВФ, а первичные и ВФ на хвосте не формируются, при этом экспрессия трансгена *Eda1* у мышей *tabby* восстанавливает формирование этих типов ВФ (Srivastava et al., 2001).

Можно заключить, что регуляторная сеть EDA/EDAR необходима для закладки остевых, зиг-заг и ВФ хвоста, а NOGGIN для закладки вибрисс, шиловидных, пуховых и зиг-заг ВФ.

При избыточной экспрессии SHH под контролем промотора гена кератин 1 в эпидермисе формируются только зиг-заг ВФ (Ellis et al., 2003). Интересно, что разные типы ВФ на спине у мыши отличаются по уникальному профилю экспрессии генов мезенхимного компонента ВФ, например, ДП всех типов ВФ, кроме зиг-заг, экспрессируют транскрипционный фактор SOX2 (Driskell et al., 2009).

1.7. РЕГУЛЯЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ

1.7.1. Индукция закладки волосяных фолликулов

Классические представления об инициации фолликулогенеза заключаются в возникновении «первого дермального сигнала» из дермы и его действии на неспециализированный эпидермис, в результате чего формируются морфологически различимые плакоды (Hardy, 1992). Экспрессируется ли «первичный дермальный сигнал» повсеместно в дерме или имеет локальный характер экспрессии, остается неизвестным.

Некоторые исследования позволяют предполагать, что с помощью механизмов латерального ингибирования, в которых участвуют диффундирующие сигналы, в эпидермисе осуществляется точная координация распределения плакод. Далее стабилизированные и развивающиеся плакоды секретируют сигнал в подлежащую дерму, способствуя формированию ДК, предшественника клеток ДП. Вероятно, впоследствии ДК в свою очередь секретирует сигнал обратно в эпителий, стимулируя пролиферацию и рост зачатков ВФ (Schmidt-Ullrich, Paus, 2005).

На ранних стадиях формирования ВФ индуктивные сигналы работают в жестких временных и пространственных рамках. Предполагают, что инициация осуществляется посредством последовательной, чередующейся секреции молекул из эпидермиса и дермы.

Однако, попытки однозначно определить место основных факторов, таких как WNT, EDA, FGF и BMP, в этом каскаде осложняются многофакторной природой этих взаимодействий и временным ограничением, в котором эти обмены происходят. Тем не менее, накопленные данные позволяют предполагать, что самым первым событием является повсеместная экспрессия лигандов WNT в эпидермисе. (Sennett, Rendl, 2012). Название семейства генов *Wnt* происходит от комбинации букв гена «*Wingless*» у плодовой мушки и его гомолога «*Int*» у позвоночных. Впервые ген описан был у *Drosophila melanogaster*, как ответственный за развитие крыльев. Сейчас WNT представляет большой класс секретируемых морфогенов, которые определяют паттерн развития во всех многоклеточных организмах.

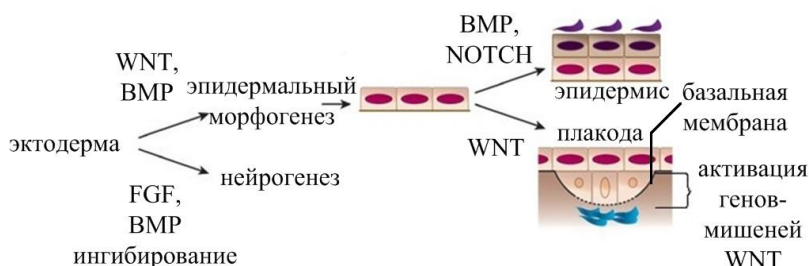


Рисунок 9. Эпидермальный морфогенез (по Fuchs, 2007 с изменениями)

После гаструляции WNT сигналинг блокирует способность эктодермы реагировать на FGF, что приводит к повышению синтеза BMP и определяет развитие эпидермиса из эктодермы (рис. 9) (Stern, 2005; Fuchs, 2007).

Активация канонического WNT каскада начинается с взаимодействия лигандов WNT с мембранными рецепторами FZD и LRP и активации белка DVL, который ингибирует комплекс деградации β -катенина. Далее происходит стабилизация и накопление β -катенина в цитоплазме и его дальнейшая транслокация в ядро. В ядре β -катенин активирует LEF/TCF транскрипционные факторы, которые регулируют экспрессию генов мишеней сигнального пути WNT (рис. 10).

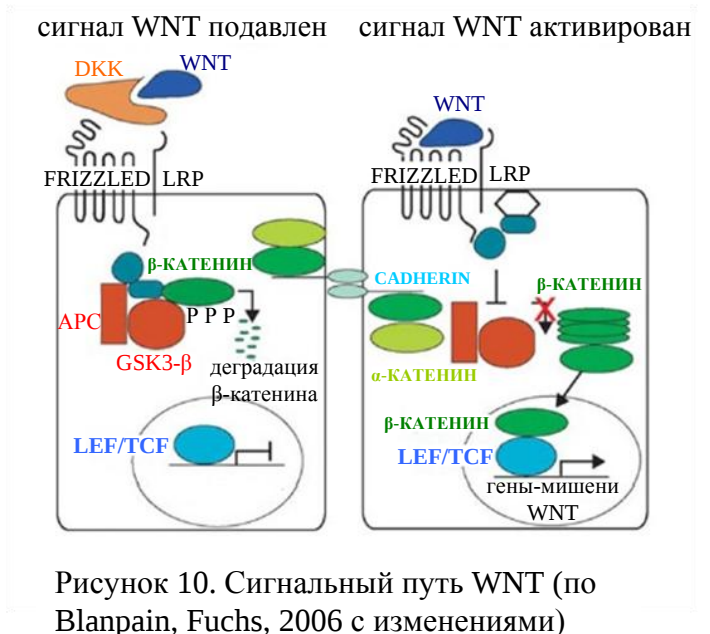


Рисунок 10. Сигнальный путь WNT (по Blanpain, Fuchs, 2006 с изменениями)

Во время формирования ВФ в эмбриональной коже экспрессируется множество белков WNT (Reddy et al., 2001). Активация сигнального пути WNT/ β -катенин очевидна и в эпителии, и в подлежащей мезенхиме (DasGupta, Fuchs 1999; Andl et al., 2002; Zhang et al., 2008). Активация β -катенина необходима для инициации развития ВФ. Известно, что делеция β -катенина в эпидермисе приводит к остановке формирования плакод (Huelsen et al., 2001). Также было показано, что эктопическая экспрессия DKK1, ингибитора WNT, в эпидермисе приводит к отсутствию ВФ, зубов и молочных желез (Andl et al., 2002). Важность сигнального каскада WNT в процессе закладки ВФ уже хорошо установлена. Однако, до сих пор не ясно, кому принадлежит первенство его экспрессии – эпидермису или дерме. Jiang Fu и Wei Hsu провели исследование морфогенеза ВФ на мутантных мышях, у которых *Gpr177* был удален последовательно в эпидермисе, а потом в дерме. GPR177 – это трансмембранный белок, необходимый для секреции, транспорта и экскреции WNT. Авторы показали, что только эпидермальная, а не дермальная секреция WNT необходима для инициации фолликулогенеза. Однако дальнейшее развитие фолликула требует реципрокного эпителио-мезенхимного взаимодействия. Экспрессия стабилизированной формы β -катенина в эпидермисе (в условиях отсутствия эпидермальной секреции WNT) восстанавливала формирование плакод, но ДК при этом отсутствовал. Это подчеркивает, что для образования плакод достаточно осуществления аутокринного сигнального пути WNT, но для образования ДК необходим паракринный каскад WNT. Результаты, проведенного исследования, также позволяют сделать следующие выводы: сигнальный каскад WNT действует раньше сигналов EDA, SHH и BMP2/4. Сигнальный каскад

WNT не является кандидатом в «первичный дермальный сигнал». Активация сигнального пути WNT в коже происходит еще до видимых морфологических признаков морфогенеза ВФ на E13.5 (Fu, Hsu, 2012).

Таким образом, на сегодняшний день мы до сих пор не имеем представления, какой дермальный сигнал вызывает инициацию фолликулогенеза, но знаем, что это не WNT (рис. 11).

Концепция индуктивной дермы была описана много лет назад на основании классических экспериментов по рекомбинации ткани. В эмбриональной коже мышиных и куриных

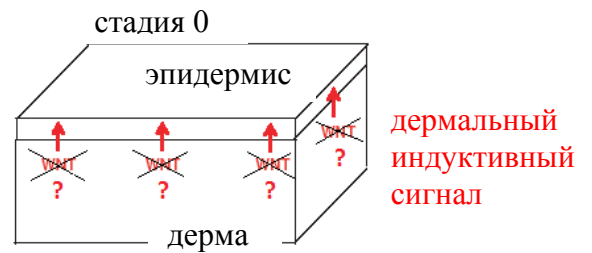


Рисунок 11. Индукция закладки волосяных фолликулов (по Van Raamsdonk, 2009 с изменениями)

эмбрионов отделяли эпидермис от дермы и комбинировали дерму волосистой части спины с безволосым эпидермисом стопы или наоборот, далее культивировали и оценивали рост фолликулов (Kollar, 1970; Dhouailly, 1973). Результаты трансплантаций показали, что только дерма волосистой части способна индуцировать формирование придатков. Таким образом, возникла концепция, что индуктивный потенциал заложен в дерме и только происхождение дермальной ткани диктует, где будут развиваться кожные придатки.

Позже было показано, что не только эмбриональная дерма, но и выделенная постнатально ДП способна индуцировать образование фолликула (Oliver, 1967, 1970; Jahoda et al., 1984). Однако, механизмы формирования фолликула в этом случае отличаются. Эмбриональная дерма индуцирует формирование эпидермальных плакод и развитие последующего морфогенеза ВФ, а постнатальная ДП вызывает инвагинацию базального слоя эпидермиса, который окружает ДП и образует луковицу, иницируя стадию роста фолликула в цикле регенерации (Inamatsu et al., 2006).

Несмотря на то, что концепция индуктивной дермы была описана много лет назад, механизмы, лежащие в ее основе, остаются до конца не раскрытыми. Также не описан определенный эпителиальный сигнал, обеспечивающий конденсацию дермальных клеток.

1.7.2. Образование и стабилизация плакоды

Первым морфологическим признаком начала формирования ВФ является образование группы эпидермальных клеток, называемых плакодами. Кератиноциты в плакоде плотно упакованы и имеют цилиндрическую форму. Маркерами плакод являются сигнальные молекулы WNT 2, 7b, 10a, 10b (Fu, Hsu, 2012), β -катенин, LEF1, EDAR, BMP2, DKK4, SHN.

Накопленные данные по изучению последовательности экспрессии сигналов, осуществляющих закладку ВФ, свидетельствуют, что сигнальный каскад EDAR является мишенью каскада WNT и активируется вскоре после него на E14.5, что совпадает с инициацией стадии плакоды (Zhang et al., 2009). Сигнальный путь EDAR реализуется исключительно в эпидермисе и необходим для распределения и стабилизации плакод.

Изоформа эктодисплазина EDAA1 является лигандом и относится к семейству фактора некроза опухоли TNF. Связывание EDAA1 с рецептором EDAR приводит к отделению NF- κ B от его репрессора, ядерной транслокации транскрипционного фактора NF- κ B и активации его сигнального пути в развивающихся плакодах ВФ (рис. 12) (Schmidt-Ullrich, 2001, 2006).

Мутации, инактивирующие гены EDA/EDAR/NF- κ B сигнального пути или подавление активности NF- κ B при помощи активации трансдоминантного суперрепрессора I κ B α Δ N вызывают блокирование ранних стадий формирования остевых и зигзаг ВФ, но не влияют на развитие шиповидных ВФ и вибрисс. При этом обнаруживаются временные структуры преплакод, которые не сохраняются, так как не способны экспрессировать белки SHN и циклин D1, необходимые для пролиферации плакод и реализации дальнейшего морфогенеза ВФ (Schmidt-Ullrich et al., 2006).

Мыши с супрессией активности NF- κ B имеют идентичный эпидермальный фенотип с мутантами по *EdaA1* (*Tabby*) и *Edar* (*downless*), который аналогичен наследственному заболеванию у людей (hypohidrotic ectodermal dysplasia), вызывающему сильные дефекты развития ВФ, коренных зубов и экзокринных желез (Schmidt-Ullrich et al., 2006). Было показано, что экспрессия трансгена *EdaA1* у мышей *Tabby* восстанавливает образование потовых желез, коренных зубов, и ВФ хвоста (Srivastava et al., 2001). По другим данным, тетрациклин-зависимая экспрессия трансгена *EdaA1* (но не *EdaA2*) у мышей *Tabby* по сравнению с мышами

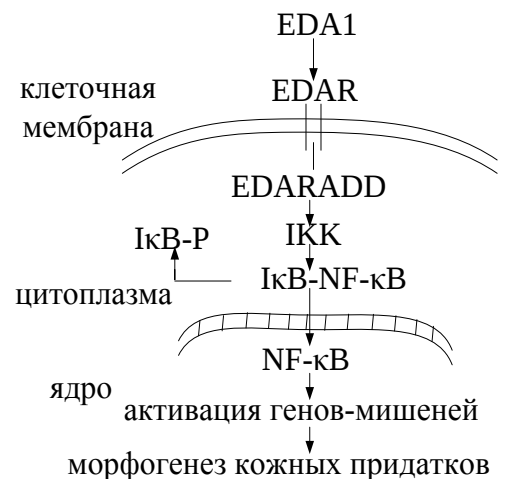


Рисунок 12. Сигнальный путь EDA/ EDAR/ NF- κ B

дикого типа приводила к восстановлению формирования первичных ВФ, но не зиг-заг ВФ. У мышей дикого типа экспрессия трансгена *EdaA1* подавляла формирование зиг-заг ВФ, приводила к гипертрофии Мейбомиевых желез (видоизмененные сальные железы по краям век). При этом Мейбомиевы железы у мышей *Tabby* в этих условиях не восстанавливались. Интересно, что и у мутантов *Tabby* и у мышей дикого типа увеличение экспрессии трансгена *EdaA1* вызывало пролиферацию себоцитов, гиперплазию сальных желез и увеличение продукции кожного сала (Cui et al., 2003). Сверхэкспрессия *EdaA1* приводит к формированию плакод ВФ увеличенного размера, дополнительных зубов и молочных желез. Аналогично, обработка эксплантатов эмбриональной кожи рекомбинантным EDAA1 оказывает дозозависимое влияние и вызывает увеличение размера плакод, вплоть до слияния соседних плакод (Mustonen et al., 2004). Интересным наблюдением в раннем исследовании являлось отсутствие экспрессии WNT10b у мышей *Tabby* (Andl et al., 2002), это позволяло предположить, что *EdaA1* прямо или косвенно стимулирует экспрессию WNT10b, таким образом, активируя канонический сигнальный путь WNT. Позже эти данные подтвердились: было показано, что WNT10b является потенциальной прямой мишенью NF-κB, и сигнальный путь NF-κB необходим для сохранения, поддержания и усиления активности сигнального пути WNT/β-катенин на поздних стадиях развития остевых ВФ (Zhang et al., 2009). По результатам некоторых исследований выдвинуты предположения, что сигнальный каскад EDAR модулирует экспрессию ингибитора WNT, DKK4 (Cui et al., 2010), который вероятно является его даунстрим мишенью (Fliniaux et al., 2008).

Пространственная организация и паттерн остевых ВФ в эпидермисе также достигается модуляцией сигналов EDAR и BMP, которые оказывают взаимовлияние в механизме активации и ингибирования. При этом EDA повышает экспрессию EDAR, который индуцирует экспрессию молекул BMP, которые, в свою очередь, ингибируют EDAR. Активация EDAR также индуцирует экспрессию CTGF, ингибитора BMP. Это позволяет достичь отложенной работы механизма закладки остевых ВФ (Mou et al., 2006). Ингибиторная роль молекул BMP в формировании ВФ также подтверждается на модели мутантных мышей с делецией *Bmpr1a*, рецептора BMP. В эмбриональном эпидермисе этих животных увеличивается плотность ВФ после E16.5, т.е. к концу формирования остевых ВФ (Andl et al., 2004).

NOGGIN является ингибитором BMP, экспрессируется в ДК, и, посылая сигналы из дермы эпидермису, также является регулятором баланса системы активатор-ингибитор в процессе формирования ВФ. NOGGIN, устраняя ингибиторное действие BMP, способен частично восстанавливать формирование плакод в эксплантатах *Eda*^{-/-} эмбриональной кожи (Pummila et al., 2007). Избыточная экспрессия *Noggin* в эпидермисе приводит к увеличению плотности ВФ, преимущественно возрастает количество вторичных ВФ (Plikus et al., 2004), а

при конститутивной делеции *Noggin* замедляется стадия индукции фолликулогенеза (Botchkarev et al., 1999, 2002). Удаление *Noggin* у мышей приводит к специфическому подавлению развития вторичных нетилотриховых ВФ, в то время как остевые ВФ формируются, но останавливаются в развитии на стадии вставания из-за отсутствия экспрессии LEF1 и SHH (Botchkarev et al., 2002). Данный фенотип мутантных мышей, вероятно, определяет NOGGIN в качестве главного ингибитора BMP, необходимого для формирования вторичных, не остевых ВФ. Для закладки остевых ВФ роль ингибитора принадлежит CTGF.

Последствия отмены сигнальных каскадов EDAR и NOGGIN наглядно демонстрируют, что для формирования первичных ВФ требуется работа сигнального пути EDA/EDAR/NF-κB, тогда как для инициации развития вторичных ВФ необходим NOGGIN. Результаты многочисленных исследований позволяют представить модель

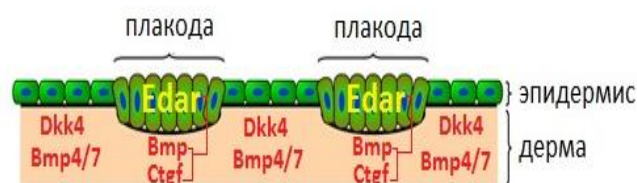


Рисунок 13. Стабилизация плакод остевых волосяных фолликулов.

Желтый цвет – активаторы, красный цвет – ингибиторы.

стабилизации плакод остевых ВФ, в которой DKK4 и BMP4/7 диффундируя латерально, ингибируют индукцию плакод в окружающем межфолликулярном эпидермисе. Таким образом, плакоды остевых ВФ остаются незатронутыми, благодаря отлаженной работе активаторов и ингибиторов фолликулогенеза, соответственно EDA/EDAR и BMP, CTGF (рис. 13). Последние являются даунстрим мишенью сигнального пути EDA/EDAR/NF-κB (Sick et al., 2006; Mou et al., 2006; Pummila et al., 2007; Cui et al., 2010).

Для дальнейшего развития плакод ВФ необходим Sonic hedgehog (SHH), который также является даунстрим мишенью сигнального каскада EDAR (Pummila et al., 2007).

1.7.3. Образование дермального компонента волосяных фолликулов

Природа эпителиального сигнала, необходимого для формирования ДК, стабилизации и сохранения ДП, до сих пор остается неизвестной. Однако много данных накоплено о необходимости молекул, членов семейства WNT, PDGF-A и SHH в процессах стабилизации дермальной составляющей ВФ (Andl et al., 2002, Karlsson et al., 1999; St-Jacques et al., 1998). У мышей *Shh*^{-/-} отсутствует характерная экспрессия WNT5a, маркера ДП, который вероятно является мишенью SHH и необходим для пролиферации, созревания и сохранения ДП на стадии 2-4 морфогенеза ВФ (Reddy et al., 2001). В коже мышей *Shh*^{-/-} формируется недоразвитый ДК. В трансплантатах кожи мышей *Shh*^{-/-} иммунодефицитным мышам Nude образуются большие эпителиальные структуры, подобные луковице ВФ, которые ассоциированы с редко встречающейся, малоклеточной ДП (St-Jacques et al., 1998).

ДК в эмбриогенезе и сформированная ДП мыши начинают экспрессировать Versican (Kishimoto et al., 1999), HGF (Lindner et al., 2000), NCAM (Kaplan, Holbrook, 1994; Müller-Röver et al., 1998), Syndecan-1 (Richardson et al., 2009), SOX2 (Driskell et al., 2009), Corin (Enshell-Seijffers et al., 2008), CD 133 (Prominin-1) (Ito et al., 2007). По мере созревания ДП в ней увеличивается активность щелочной фосфатазы, которая служит индикатором нарастающего индуктивного потенциала ДП. Активность щелочной фосфатазы изменяется с вступлением ВФ в цикл регенерации, пик ее активности в ДП детектируется в раннем анагене, а спад – соответственно, в катагене и телогене. При этом на стадии катагена и телогена устойчивая эндогенная активность щелочной фосфатазы наблюдается в сальных железах (Paus et al., 1999; Handjiski et al., 1994; Iida et al., 2007).

Рецептор к нейротрофинам p75 помимо нервных волокон, ассоциированных с ВФ, также экспрессируется в ДК и ранней ДП до стадии 7 морфогенеза ВФ мыши. После развития ВФ его экспрессия в ДП исчезает и появляется в наружном корневом влагалище ВФ. Интересно, что у мышей *p75*^{-/-} ускоряется морфогенез ВФ и снижается пролиферативная способность клеток ДП, их активность меняется в сторону дифференцировки (Botchkareva et al., 1999).

FGF20 экспрессируется в плакодах и является индуктором формирования ДК первичных и вторичных ВФ, активируется сигналами каскадов WNT/ β -катенин и EDA/EDAR. У мутантных мышей *Fgf20*^{-/-} отсутствует ДК первичных волос, однако регулярный паттерн плакод ВФ формируется. То, что инициация морфогенеза ВФ у данных мутантных мышей проходит без видимых признаков ДК является удивительным фактом, который дает возможность предполагать, что закладки плакод ВФ организуется независимо от формирования ДК (Huh et al., 2013).

Сигналы FGF функционируют на разных стадиях развития ВФ. FGF рецептор 2b в развивающейся коже экспрессируется в эпителии, его удаление приводит к запаздыванию и формированию малого числа ВФ (Petiot et al., 2003). Делеция обоих рецепторов *Fgfr1* и *Fgfr2* в кератиноцитах приводит к потере ВФ с возрастом (Yang et al., 2010). FGF10 необходим для формирования вибрисс (Ohuchi et al., 2003). FGF7, напротив, ингибирует индукцию ВФ (Richardson et al., 2009).

Исследование роли сигнального пути NOTCH в формировании ВФ в коже овец показало, что активация NOTCH1 необходима для агрегации мезенхимных клеток в ДК. По мере формирования ДК, число клеток, экспрессирующих DELTA1, увеличивается (Xavier et al., 2013).

1.7.4. Проплиферация кератиноцитов и рост волосяных фолликулов

После стадии плакоды кератиноциты начинают активно пролиферировать и инвагинировать в дерму, образуя зачаток ВФ в виде «столбика». Центральная роль в процессе пролиферации и вставания кератиноцитов зачатка ВФ отводится сигнальному каскаду SHH.

Сигнальный путь Hedgehog впервые был выявлен у дрозофилы как ответственный за передне-заднюю ориентацию развивающихся структур в эмбрионе и личинке. Название гена происходит от колючего, «ежеподобного» фенотипа у плодовых мушек с мутациями в гене *Hedgehog* (англ. hedgehog – «ёж»). Сигнальный путь Hedgehog эволюционно консервативен от насекомых до позвоночных. У позвоночных известны такие гомологи Hedgehog, как Desert hedgehog, Indian hedgehog и Sonic hedgehog (SHH). Наиболее изученным является SHH.

Передача сигнала SHH инициируется связыванием лиганда SHH с трансмембранным рецептором Patched (PTCH) (рис. 14). При этом трансмембранный белок HIP (Hedgehog interacting protein) тоже связывает лиганды SHH, предотвращая их избыток. В отсутствии лигандов рецепторы PTCH ингибируют функцию белка Smoothed (SMO). Взаимодействие лигандов SHH с рецепторами PTCH приводит к активации и фосфорилированию белков SMO. Это

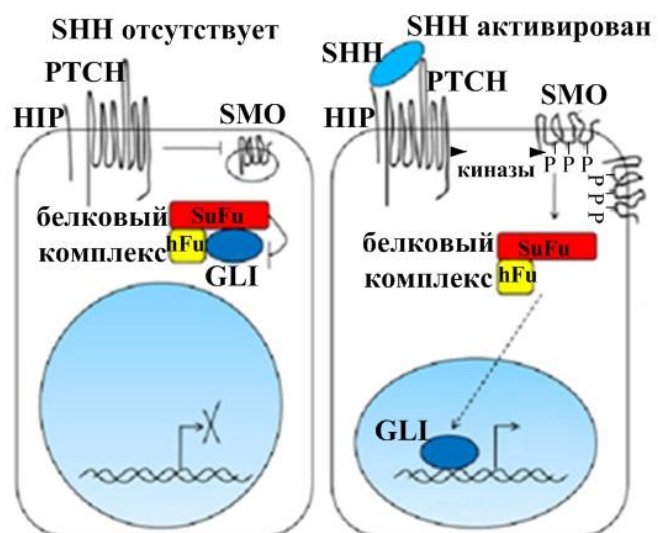


Рисунок 14. Сигнальный путь SHH (по Donovan, 2009 с изменениями)

способствует модуляции белкового комплекса, изолирующего GLI, высвобождению транскрипционных факторов GLI из комплекса и транслокации их в ядро, где они активируют транскрипцию генов мишеней.

Реализация сигнального пути SHH необходима для поддержания гомеостаза кожи и формирования ее придатков. SHH сначала экспрессируется в плакодах ВФ, по мере прогрессии морфогенеза экспрессия SHH ограничена в проксимальной части зачатка ВФ, прилегающего к ДП (Iseki et al., 1996). Рецептор PTCH1 и транскрипционный фактор GLI1 в раннем развитии фолликула экспрессируются в обоих компонентах ВФ (Karlsson et al., 1999; Chiang et al., 1999). Важность сигнального каскада SHH в развитии ВФ была выяснена после получения мышей, нокаутированных по этому гену. В коже мышей *Shh*^{-/-} ВФ не развивались дальше стадии плакоды, из чего следовало, что SHH не важен для инициации ВФ, а необходим для последующих стадий фолликулогенеза (St-Jacques et al., 1998; Chiang et al., 1999). Мыши *Gli2*^{-/-} имеют фенотип, подобный мышам *Shh*^{-/-}. Участие GLI3 не существенно для развития ВФ. Активация GLI2 при реализации сигнального пути SHH играет критическую роль в развитии ВФ, обеспечивая пролиферацию путем транскрипционного контроля регуляторов клеточного цикла, циклинов D1 и D2 (Mill et al., 2002).

Чтобы понять, как сигнальный путь SHH вписан в контекст эпителио-мезенхимных взаимодействий, исследовали последствия тканеспецифического удаления компонентов первичной реснички, которое приводило к отмене сигнального каскада SHH в эпителии или в дерме. Первичная ресничка – маленькая органелла (2-5 мкм в длину), состоящая из микротрубочек, участвующая в регуляции сигнального пути SHH. Мутации в генах, кодирующих внутригвутиковые транспортные белки ослабляют передачу сигнала SHH и приводят к различного рода дефектам зачатков конечностей и нервной трубки, подобные тем, которые наблюдают при инактивирующих мутациях участников сигнального пути SHH. Мыши, у которых инактивация SHH проходила в дерме, имели фенотип, схожий с фенотипом мышей *Shh*^{-/-} или мышей *Gli2*^{-/-} (Lehman et al., 2009; Croyle et al., 2011). При удалении *Smo* в ранней эмбриональной дерме ВФ прекращали развиваться на стадии 2, а ДК к моменту рождения эмбрионов дегенерировали. В этом исследовании, было убедительно доказано, что реализация сигнального пути SHH в клетках ДК является критичной для развития ДП и формирования ВФ. Интересно, что избыточная экспрессия NOGGIN частично восстанавливала данный фенотип, указывая на то, что для созревания ДП необходимо поддержание реципрокной регуляторной петли SHH и NOGGIN (Woo et al., 2012).

Для сохранения ДП также, по-видимому, необходимо участие SHH в кластеризации PDGFA–положительных мезенхимных клеток ДК под плакодами, поскольку у мышей *Shh*^{-/-} компактизация этих клеток отсутствует. Роль сигнального пути PDGF в морфогенезе ВФ была

изучена на мышах *Pdgfra*^{-/-}, которые имели редкий шерстный покров, ВФ дегенерировали с возрастом. Лиганд PDGFA экспрессируется в эпидермисе развивающегося ВФ, а его рецептор PDGFRA в дерме. На E13.5 PDGFA экспрессируется во всем эпидермисе. С появлением плакод, лиганд также устойчиво экспрессируется и в них. Рецептор PDGFRA экспрессируется во всей папиллярной дерме, затем ограниченно, только в ДК, ДП и соединительно-тканном чехлике. У мутантов *Pdgfra*^{-/-} ВФ формируются, хотя и в ограниченном количестве, деформированные, с тонким стержнем, миниатюрной ДП и аномально развитым соединительно-тканным чехликом. По-видимому, сигнальный путь PDGF не критичен для индукции ВФ, но важен для стимуляции пролиферации клеток ДП и соединительно-тканного чехлика, формирования полноценной структуры ВФ (Karlsson et al., 1999).

Сигнальный путь TGF- β также обеспечивает рост зачатка ВФ. Рецептор TGF- β типа II на начальных стадиях морфогенеза экспрессируется исключительно кератиноцитами плакод и зачатков ВФ, а на поздних стадиях в наружном корневом влагалище ВФ (Paus et al., 1997). Критическую роль в фолликулогенезе играет изоформа TGF- β 2. Удаление именно этой изоформы, а не TGF- β 1 и TGF- β 3 приводит к полной задержке развития ВФ, при этом число закладывающихся ВФ снижается до 50%. Обработка эксплантатов нормальной эмбриональной кожи мыши (E14.5 или E15.5) TGF- β 2 индуцирует развитие ВФ. Фенотип *Tgf- β 2*^{-/-} мышей напоминает фенотип *Shh*^{-/-} мутантов. Но, так как остановка развития ВФ у *Shh*^{-/-} мутантов происходит на стадии 1, а у *Tgf- β 2*^{-/-} на стадиях 2-3, то, предположительно, TGF- β 2 может быть мишенью сигнального пути SHH (Foitzik et al., 1999).

1.7.5. Дифференциация кератиноцитов волосяных фолликулов

После первых стадий образования ВФ, в результате множественных взаимодействий зачатка ВФ с ДК запускается механизм дифференцировки фолликулярных кератиноцитов. Недифференцированные кератиноциты могут дифференцироваться в кератиноциты матрикса ВФ, внутреннего корневого влагалища и клетки структур стержня волоса. Сложный процесс становления структур ВФ помимо эпителио-мезенхимного взаимодействия и экспрессии ключевых генов стратификации, включает множественные процессы адгезии, миграции и ремоделирования БМ, секрецию специфических лигандов внеклеточного матрикса (ВКМ) и рецепторов к ним.

После стадии 3 в массе концентрически расположенных кератиноцитов фолликула выделяется группа эпителиальных клеток, находящихся непосредственно над ДК, которая начинает формировать внутреннее корневое влагалище и прекортекс в виде конуса. ДК в это время активно инвагинирует в луковицу, кератиноциты луковицы фолликула в свою очередь

окружают его, формируя округлую ДП. Клетки, которые дифференцируются в кератиноциты внутреннего корневого влагалища, начинают синтезировать белки-компоненты роговой оболочки (лорикрин, инволюкрин, трансглутаминазу), что определяет их сходство с супрабазальными кератиноцитами. Однако, они также начинают экспрессировать специфичный для них трихогиалин, кросс-линкер кератиновых филаментов, который синтезируют и клетки формирующейся медуллы (Alibardi, 2004). Нарушения сигнального пути через EGFR могут вызывать дефекты кератинизации внутреннего корневого влагалища и приводить к продукции волнистых стержней волос (Hansen et al., 1997).

Реализация сигнального пути BMP необходима для дифференциации кератиноцитов матрикса в кератиноциты внутреннего корневого влагалища и стержня волоса. Отсутствие рецептора BMPRII ведет к неспособности клеток матрикса дифференцироваться, их повышенной пролиферативной активности и образованию опухоли (Ming Kwan et al., 2004).

Ключевую роль в комитировании эпителиальных клеток ВФ в направлении формирования внутреннего корневого влагалища играет репрессор транскрипции белок CDP («CCAAT displacement protein»), продукт гена *Cutl1*, и транскрипционный фактор GATA-3. У мышей *Cutl1*^{-/-} формируется редкий шерстный покров, стержни волос сильно деформированы, число клеточных слоев внутреннего корневого влагалища сокращено, а наружного корневого влагалища наоборот увеличено (Ellis et al., 2001). Отсутствие GATA-3 приводит к увеличению числа прогениторных клеток внутреннего корневого влагалища, которые не способны дифференцироваться и экспрессировать гены, характерные для зрелых кератиноцитов внутреннего корневого влагалища. Однако, кератиноциты коркового слоя дифференцируются и продуцируют недоразвитый стержень волоса (Kaufman et al., 2003). Предполагают, что в середине анагена прогениторные клетки наружного корневого влагалища происходят из латерально мигрирующих клеток БЖ, а внутреннее корневое влагалище (и структуры стержня) образуется из дифференцированных клеток матрикса волоса (Panteleev et al., 2001). Для развития внутреннего корневого влагалища и стержня волоса из клеток матрикса волоса также необходима экспрессия NOTCH1 (Favier et al., 2000).

Активация сигнала осуществляется при связывании мембранного рецептора NOTCH1 с лигандами JAGGED 1,2 или DELTA-like 1,2,3,4 (рис. 15). Затем мембранный рецептор NOTCH1 расщепляется γ -секретазой, что приводит к высвобождению внутриклеточного домена NCID. Далее NCID транспортируется в ядро, где взаимодействуя с ДНК-связывающим белком RBP-J κ , формирует транскрипционный комплекс с ядерными факторами и инициирует транскрипцию генов-мишеней.

Анализ мутаций генов, участников сигнального пути NOTCH, которые приводили к усилению или отсутствию функции гена, показал, что нарушение сигнального пути NOTCH в эмбриогенезе не оказывает существенного влияния на

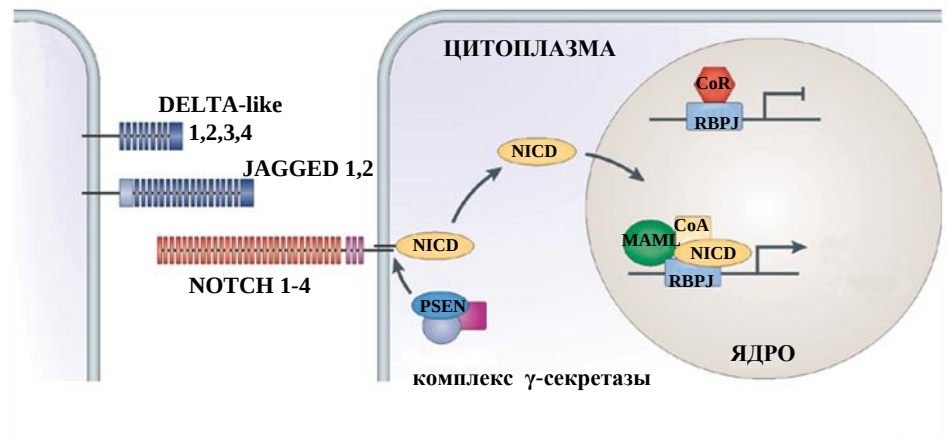


Рисунок 15. Сигнальный путь NOTCH

закладку ВФ. Размер и распределение зачатков ВФ у мутантных мышей были сопоставимы с таковыми у мышей дикого типа (Blanpain et al., 2006; Demehri, Kopan, 2009; Estrach et al., 2006; Lee et al., 2007; Pan et al., 2004; Yamamoto et al., 2003; Estrach et al., 2008; Vauclair et al., 2005). Таким образом, сигнальный каскад NOTCH не обязателен для инициации развития ВФ. Однако, он играет ключевую роль в процессе дифференциации и образовании множества клеточных типов ВФ на поздних стадиях эмбриогенеза и в постнатальном периоде развития (Lin et al., 2000; Uyttendaele et al., 2004; Estrach et al., 2006).

Избыточная экспрессия активной формы NOTCH1 под промотором гена кератина A1 приводила к нарушению программы дифференциации кутикулы и медуллы, дефектам стержня волоса (Lin et al., 2000). Кератин A1 синтезируется в клетках кортекса стержня волоса. Повышенная экспрессия активной формы NOTCH1 в клетках, экспрессирующих инволюкрин, приводила к формированию у трансгенных мышей неполноценного шерстного покрова с короткими, курчавыми, беспорядочно расположенными волосами и развивающейся с возрастом алопецией. У данных мышей были выявлены нарушения дифференциации клеток внутреннего корневого влагалища (Uyttendaele et al., 2004). В норме инволюкрин синтезируют клетки супрабазальных слоев межфолликулярного эпидермиса и внутреннего корневого влагалища фолликула. При экспрессии активной формы NOTCH1 под промотором гена цитокератина 14 увеличивались сальные железы, формировались скученные ВФ, которые с возрастом преобразовывались в цисты. Цисты состояли из увеличенной луковицы фолликула, окруженной aberrantным стержнем волоса (Estrach et al., 2006). Цитокератин 14 синтезируют клетки наружного корневого влагалища и сальной железы. В этих трех моделях изменения сигнального пути NOTCH были достигнуты при помощи сверх- или эктопической экспрессии активной формы NOTCH1 в различных слоях ВФ. В свою очередь, удаление генов-участников сигнального пути NOTCH в клетках, синтезирующих цитокератины 5 или 14, приводило к ослаблению программы дифференциации внутреннего корневого влагалища, неполноценному

формированию структур стержня волоса и зачастую развитию алопеции (Blanpain et al., 2006; Vauclair et al., 2005; Estrach et al., 2006). У мышей *Notch1*^{-/-} формировался короткий, тонкий, волнистый стрежень волоса, с возрастом происходило снижение числа ВФ и потеря волос (Vauclair et al., 2005). Фенотип нокаутных мышей *Jagged-1*^{-/-} был подобен фенотипу, наблюдаемому у мышей *Notch1*^{-/-} (Estrach et al., 2006). Этот факт указывает на ключевую роль JAGGED-1 как лиганда для NOTCH1 в постнатальный период развития ВФ. Более того, JAGGED-1, вероятно, является даунстрим эффектором β -катенина на стадии анагена (Estrach et al., 2006; Ambler, Watt, 2007). При удалении RBP-Jк в развитых ВФ, структуры внутреннего корневого влагалища и стержня волоса сильно деформированы, в конечном итоге ВФ образуют цисты (Blanpain et al., 2006).

Параллельно с регуляцией программы дифференциации и образования структур стержня ВФ, сигнальный путь NOTCH необходим для осуществления дифференциации и надлежащей стратификации во время развития эпидермиса (Nickoloff et al., 2002; Blanpain et al., 2006; Rangarajan et al., 2001; Moriyama et al., 2008). Реализация канонического сигнального пути NOTCH/RBP-Jк приводит к репрессии генов базальных клеток и активации генов, ответственных за формирование кератиноцитов шиповатого слоя (Blanpain et al., 2006). Результаты многочисленных исследований и *in vitro* и *in vivo* позволяют рассматривать ключевую роль сигнального пути NOTCH в детерминации шиповатых кератиноцитов, выхода базальных кератиноцитов из клеточного цикла и терминальной дифференциации супрабазальных клеток (Blanpain et al., 2006; Rangarajan et al., 2001; Moriyama et al., 2008).

В процессе инициации дифференциации кератиноцитов также играет роль транскрипционный фактор WHN (FOXP1, HNF 11) (winged-helix/forkhead). Отсутствие WHN вызывает фенотип «голых» мышей (Nude), у которых не развивается тимус и отсутствуют видимые стержни волос, так как они не способны протолкнуться через эпидермис (Mecklenburg et al., 2001, 2005). Благодаря своему фенотипу и отсутствию иммунитета мыши Nude активно используются исследователями в разноплановых экспериментах. В эмбриональном эпидермисе экспрессия WHN супрабазальными клетками по времени совпадает с появлением экспрессии первого маркера дифференцировки цитокератина 1. В развивающихся ВФ WHN синтезируется в кератиноцитах внутреннего корневого влагалища и клетках-предшественниках стержня волоса (Lee et al., 1999).

Регулятором формирования внутреннего корневого влагалища также является транскрипционный фактор HOXC13. Он экспрессируется в дифференцирующихся клетках, образующих стрежень волоса. Мутантные мыши по *Hoxc13* выглядят лысыми. Однако ВФ у них формируются, но развиваются сильные нарушения структур стержней волос, что приводит к их ломкости (Godwin, Capocchi, 1998).

Для формирования полноценного стержня волоса необходима экспрессия транскрипционного фактора MSX2. У мышей *Msx2*^{-/-} развивается алоpecia, вследствие дефектов дифференциации стержня волоса и нарушений циклирования ВФ (Ma et al., 2003).

Для высоко дифференцированных кератиноцитов *in vitro* и трихоцитов стержня волоса *in vivo* характерна экспрессия десмоглеина 4 – трансмембранного кадгерина, входящего в состав десмосом. В ВФ человека десмоглеин 4 синтезируется в наружном корневом влагалище, кутикуле и кортексе стержня волоса. Вероятно, этот кадгерин необходим для прочной адгезии трихоцитов и целостности стержня волоса. Мутации десмоглеина 4 вызывают гипотрихоз у людей, крыс и мышей (Bazzi et al., 2006). Интересным фактом является то, что FOXN1, NOXC13 и LEF1 репрессируют транскрипцию десмоглеина 4 *in vitro*, а сигнальный путь NOTCH наоборот активирует и стабилизирует экспрессию десмоглеина 4 *in vitro* и *in vivo* (Bazzi et al., 2009).

Для дифференциации кератиноцитов матрикса волоса в прекортикальные кератиноциты стержня необходима реализация сигнального пути WNT (DasGupta, Fuchs, 1999). У мышей *Lef1*^{-/-} ВФ спины останавливаются в развитии до стадии формирования стержня волоса (E17), вибриссы у новорожденных особей не обнаруживаются (van Genderen et al., 1994).

Эти данные отражают сложную регуляторную сеть, осуществляющую четкую и последовательную дифференциацию структур ВФ.

1.8. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

ВФ регенерирует на протяжении всего постнатального периода жизни, демонстрируя морфологические изменения. Это позволило предположить, что ВФ должен иметь нишу СК, что впоследствии было доказано. Резервуаром СК является область БЖ, морфологически отличимая выпуклость ВФ, которая на стадии роста ВФ располагается ниже сальной железы, а на стадии покоя ВФ – в его основании (рис. 16). В специализированной нише СК ВФ пребывают в состоянии покоя, но под действием активирующих сигналов мобилизуются, участвуя в цикле регенерации ВФ и репарации эпидермиса после повреждения.

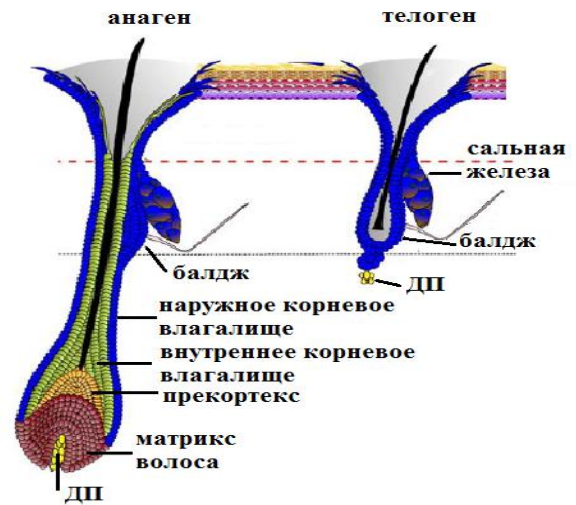


Рисунок 16. Положение балдж на стадии роста и покоя цикла регенерации волосяного фолликула (по Levy et al., 2005 с изменениями)

В литературе из множества экспериментальных данных можно выделить несколько определяющих исследований, которые показали, что зона БЖ является нишей СК. Во-первых, исследования с применением метки ^3H -тимидина и BrdU выявили медленно циклирующие, длительно сохраняющие метку клетки (label-retaining cells, LRCs) в области БЖ ВФ мыши (Cotsarelis et al., 1990; Taylor et al., 2000; Tumber et al., 2004). Во-вторых, анализ клоногенной способности выявил, что СК БЖ вибрисс крысы обладают высокой колониеобразующей активностью (Kobayashi et al., 1993). В-третьих, мечение Lac Z репортерным геном клеток БЖ у мыши показало, что клетки-потомки СК БЖ мигрируют в область матрикса луковицы ВФ на стадии роста и участвуют в формировании всех слоев клеток ВФ (Oshima et al., 2001). Более того, эти авторы в 2001 году, а позже и другие коллективы в 2004, показали, что в условиях трансплантации клетки БЖ обладают способностью восстанавливать ВФ, дифференцироваться в клетки сальной железы и межфолликулярного эпидермиса (Oshima et al., 2001; Morris et al., 2004; Blanpain et al., 2004). Однако следует отметить, что в норме СК БЖ не участвуют в формировании межфолликулярного эпидермиса (Clayton et al., 2007; Ito et al., 2005; Levy et al., 2005), и только при повреждении мигрируют в эпидермис, участвуя в процессе ранозаживления (Ito et al., 2005; Levy et al., 2007; Brownell et al., 2011). Гомеостаз сальной железы в норме, вероятно, поддерживается определенным пулом унипотентных прогениторных клеток, которые экспрессируют репрессор транскрипции BLIMP1 и находятся в основании сальной железы.

Клетки-предшественники производят пролиферирующее потомство, которое дифференцируется в себоциты. (Horsley et al., 2006).

Медленно циклирующие СК ВФ идентифицируют по длительному сохранению метки ДНК и по маркерным молекулам. Для СК БЖ мыши описаны следующие потенциальные маркеры: кератин 19 (Michel et al., 1996) кератин 15 (Morris et al., 2004), CD34 (Trempeux et al., 2003), нестин (Lee et al., 2003), LHX2 (Rhee et al., 2006; Folgueras et al., 2013), TCF3 (Nguyen et al., 2006), SOX9 (Nowak et al., 2008), NFATc1 (Horsley et al., 2008), и LGR5

(Jaks et al., 2008), Gli1 (Brownell et al., 2011). Однако, эти маркеры локализуются в разных местах области БЖ (рис. 17). При этом «идеальный» маркер СК ВФ мыши еще не найден. У человека CD200-положительные клетки БЖ обладают высокой колониеобразующей способностью, поэтому этот поверхностный антиген является одним из маркеров СК ВФ человека (Ohyama et al., 2006).

Среди маркеров области БЖ зрелых ВФ в эмбриогенезе ВФ экспрессируются немногие, в частности LHX2 и SOX9 (Rhee et al., 2006, Nowak et al., 2008). Экспрессия транскрипционного фактора LHX2 появляется на стадии плакоды, в ходе развития детектируется в зачатке ВФ, а в завершении морфогенеза ВФ в области БЖ (Rhee et al., 2006). Эксперименты на *K14-Lhx2* трансгенных мышях показали, что эктопическая экспрессия LHX2 в межфолликулярном эпидермисе приводит к подавлению терминальной дифференциации и индуцирует экспрессию маркеров СК в эпидермисе трансгенных мышей. В то же время, в отсутствии этого транскрипционного фактора у мышей *Lhx2*^{-/-} плотность ВФ снижается на ~ 40%, но плакоды все еще экспрессируют такие сигнальные молекулы фолликулогенеза, как SHN, WNT10b, BMP2, BMP4 и LEF1. Фолликулы в коже мышей *Lhx2*^{-/-} формируются, но не способны поддерживать состояние покоя и преждевременно активируются в цикле регенерации (Rhee et al., 2006). Также было показано, что в коже гетерозиготных по мутантному аллелю *Lhx2* мышей ранозаживление проходит медленнее по сравнению с нормой (Mardaryev et al., 2011). Кроме того, *Lhx2* регулирует условия ниши и экспрессию генов специфичных для СК ВФ. Без LHX2 ниша СК не может обеспечить условия для поддержания СК ВФ (в частности, апико-базальную асимметрию и организацию цитоскелета) и заякоривать стержень волоса. Отсутствие LHX2 приводит к прогрессии облысения мышей с возрастом, помимо этого СК ВФ спонтанно дифференцируются в себоциты сальной железы (Folgueras et al., 2013). Эти данные

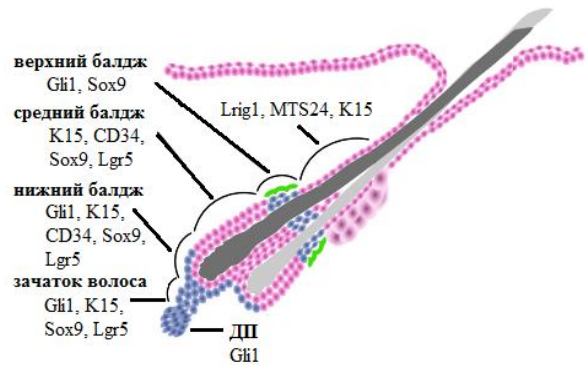


Рисунок 17. Молекулярные маркеры балдж (по Brownell et al., 2011, с изменениями)

демонстрируют, что LHX2 играет роль в сохранении ниши, свойств СК и регулирует активность СК в коже в ответ на повреждение.

Транскрипционный фактор SOX9 на ранней стадии морфогенеза ВФ экспрессируется в супрабазальных клетках плакод. По мере роста ВФ компартмент SOX9+ клеток локализуется в зоне, где в дальнейшем формируется БЖ, и играет важную роль в спецификации СК ВФ. При удалении *Sox9* в коже у нокаутных мышей блокируется морфогенез сальных желез, не формируется БЖ, что приводит к недоразвитию стержня волоса и ослаблению ранозаживления (Nowak et al., 2008).

Точная идентификация местоположения СК ВФ *in vivo* является важной проблемой биологии кожи, поскольку: 1) не определено четкое место локализации СК с момента закладки ВФ и до его морфологических преобразований в цикле регенерации; 2) нет универсального маркера СК ВФ. Известно, что эпителиальные СК обладают свойствами самообновления, мультипотентности и клоногенности подобно гематопоетической системе. Однако, состояние покоя, как полагают, основная отличительная характеристика эпителиальных СК. В этом ключе подходящим маркером СК ВФ может быть длительное сохранение метки ДНК (Tersikh et al., 2012).

I.9. ЭПИДЕРМАЛЬНАЯ БАЗАЛЬНАЯ МЕМБРАНА

Важнейшим признаком эпителия является расположение его клеток в виде пласта на БМ. Эпидермальная БМ является одной из самых хорошо изученных структур. В эпидермисе только базальные кератиноциты имеют контакт с БМ, куда они синтезируют ВКМ. Дерма содержит разные типы клеток, которые окружены ВКМ, преимущественно составляют фибробласты. Эластичность дерме придают такие белки ВКМ, как фибриллы коллагена I и III типов, микрофибриллы и эластические волокна. Оба компартмента кожи участвуют в формировании сложной, высокоспециализированной структуры матрикса – БМ. В одиночку ни кератиноциты эпидермиса, ни фибробласты дермы не способны образовать структуру БМ. Только совместный вклад синтезируемых компонентов ВКМ этими компартментами кожи приводит к формированию полноценной БМ (Marinkovich et al., 1993; El Ghalbzouri et al., 2005). Она одновременно является связующим и разделяющим слоем для этих двух тканей. Поскольку в эпидермис не проникают кровеносные сосуды, транспорт питательных веществ обеспечивает БМ, выполняя роль двустороннего избирательного фильтра (Breitkreutz et al., 2009). С помощью электронной микроскопии было показано, что БМ состоит из электронно-плотного слоя, темной пластинки (*lamina densa*) размером 50 нм; электронно-прозрачного слоя, называемого

светлой пластинкой (*lamina lucida*) размером 40 нм и фиброретикулярной пластинки (*lamina fibroreticularis*), которая представляет собой упорядоченно расположенные фибриллы коллагенов. Толщина этого слоя может достигать несколько микрометров, и преимущественно за счет него БМ бывает видна при светооптическом микроскопировании (Yurchenco, Schittny, 1990). Однако в современной литературе под БМ понимают совокупность только двух слоев – светлой и темной пластинок (Hashmi, Marinkovich, 2011). Применение электронной микроскопии с замораживанием под высоким давлением способствует лучшему сохранению архитектуры ткани (Hippe-Sanwald, 1993). Исследование зоны БМ с использованием этого метода выявило, что светлая зона БМ (*lamina lucida*) может быть артефактом дегидратации, так как фиксация материала для традиционной электронной микроскопии требует значительного обезвоживания препарата. Поэтому в некоторых работах БМ называют только одну темную пластинку. Несмотря на это, ультраструктура, полученная при традиционной электронной микроскопии все еще используется для изучения структуры БМ (Hippe-Sanwald, 1993; Keene et al., 1997; Hashmi, Marinkovich, 2011)

Зона эпителио-мезенхимных взаимодействий и компоненты базальной мембраны. Контакт базальных кератиноцитов с БМ осуществляют специализированные внутриклеточные линкерные белки, которые на одном конце связываются с кератинами или актином, а на другом с интегринами $\alpha\beta4$, $\alpha3\beta1$, ламининами и коллагенами. Все вместе, эти внутриклеточные и трансмембранные белки образуют специализированные соединения – гемидесмосомы и фокальные контакты.

Гемидесмосомы имеют форму «бляшек», или «кнопок», располагаются с внутренней стороны плазматической мембраны эпителиальных клеток. Они образованы молекулами интегрин $\alpha\beta4$, который посредством линкерных белков плакинов прикрепляется к кератиновым филаментам и прочно закрепляет эпидермис на БМ, связываясь с ее компонентами (главным образом, с ламинином-332) (рис. 18).

Фокальные контакты представляют собой более сложные структуры, которые образуются в результате группировки интегринов и через адаптерные белки (талин, винкулин, α -актинин) связываются с актиновым цитоскелетом. Состав и морфология контактов весьма динамичны. Они могут содержать до сотни различных белков, выполняющих адаптерные, сигнальные и другие функции. Фокальные контакты играют роль своеобразных «узлов связи», регулируя сигнальные каскады и управляя биохимическими сигналами и клеточными реакциями на внешние стимулы (рис. 18).

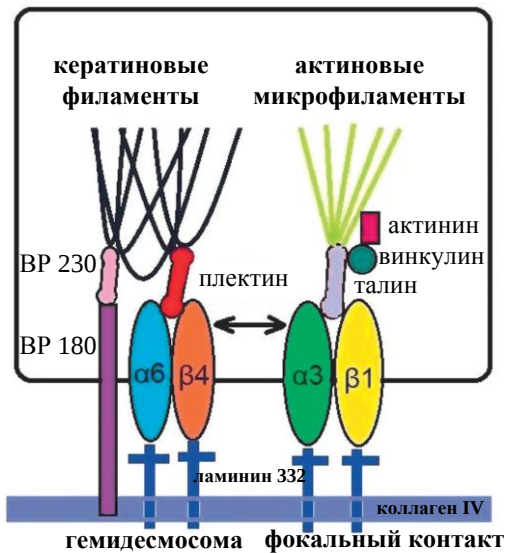


Рисунок 18. Контакты взаимодействия базальных кератиноцитов с внеклеточным матриксом (по Риппа и др., 2013)

промежуточные
филаменты→
гемидесмосома
→
заякоряющие
филаменты→
lamina densa→
заякоряющие
фибриллы→



Рисунок 19. Связь кератиноцитов с базальной мембраной (по Hashmi, Marinkovich, 2011)

Интегрины и коллаген XVII типа (BP180) в свою очередь связываются с ламининами-332 и 331, образуя заякоряющие филаменты (рис. 18, 19). Взаимодействия между этими специализированными белками и распространенными ламинином-511, коллагеном IV типа и нидогеном формируют темную базальную пластинку (lamina densa). Заякоряющие филаменты связывают эпидермис с БМ с одной стороны, с другой стороны с помощью заякоряющих фибрилл к БМ прикрепляется дерма. Заякоряющие фибриллы – это толстые, перпендикулярные тяжи, которые тянутся от lamina densa, образуя петли через промежуточные коллагеновые фибриллы к дерме и вновь прикрепляются к lamina densa (рис. 19). Заякоряющие фибриллы в основном состоят из коллагена VII типа. Этот белок необходим для сохранения дермально-эпидермального сцепления, особенно путем связывания с ламинином-332 (Ortiz-Urda et al., 2005). Коллаген VII типа связывается также с коллагенами I типа и IV типа, которые позволяют молекуле коллагена VII типа соединять lamina densa с папиллярной дермой.

Такие белки, как нидоген, коллаген IV типа, перлекан, ламинин-511 входят в состав множества базальных пластинок в организме. Эти молекулы важны для сборки основной структуры БМ (Yurchenco et al., 2002). Предполагают, что нидогены (энтактины) являются одними из главных организаторов сборки БМ, связывая ламинины с коллагеном IV типа и перлеканом (Hashmi, Marinkovich, 2011). Нидогены экспрессируются мезенхимными клетками и, главным образом, найдены в эпителиальных и эндотелиальных БМ в процессе развития (Fleischmajer et al., 1995). После секреции нидоген связывается с ламининами и коллагеном IV типа, образуя между ними «мост» (Ries et al., 2001; Takagi et al., 2003). Связь нидогена с

ламинином хорошо охарактеризована и представляет пример одной из самых высоко аффинных связей в природе (Takagi et al., 2003).

Коллаген IV типа – один из самых распространенных коллагеновых гликопротеинов БМ, составляющих более половины ее массы. Он состоит из 3-х α -цепей. Существует 6 изоформ коллагена IV типа, при этом каждая кодируется отдельным геном (Yurchenco, Furthmayr, 1984). Несмотря на то, что ламинины могут инициировать сборку БМ и в отсутствие коллагена IV типа (Miner et al., 2004; Smyth et al., 1999; Pöschl et al., 2004), в дальнейшем он необходим для обеспечения барьерной функции и поддержания целостности БМ в связи с увеличением механической нагрузки по мере роста эмбриона (Pöschl et al., 2004).

Перлекан – это гепаран-сульфатный протеогликан, способный связываться с нидогеном, коллагеном IV типа, α -цепью ламинина, а также с другими белками ВКМ, ростовыми факторами и рецепторами (Whitelock et al., 2008).

Ламинины – гликопротеиновые гетеротримеры, состоящие из α -, β -, и γ -цепей. Пять α , четыре β и три γ -цепи (Miner and Yurchenco, 2004) образуют 16 различных изоформ (Aumailley et al., 2005). α -цепи взаимодействуют с разнообразными рецепторами на поверхности клеток, преимущественно интегринами, что критично для их самосборки и установления ламининовой сети, необходимой для формирования БМ (Miner, 2008; Durbéej, 2010). В эпидермальной БМ зрелой кожи мыши $\alpha 5$ и $\alpha 3$ цепи ламинина экспрессируются повсеместно, тогда как экспрессия $\alpha 1$ цепи главным образом распространена в межфолликулярной зоне эпидермиса, а $\alpha 2$ и $\alpha 4$ цепи – в ВФ. Также отмечается очаговая экспрессия $\alpha 2$ и $\alpha 4$ цепи в межфолликулярном эпидермисе (Watt, Fujiwara, 2011).

Ламинин-511 (ламинин 10) и ламинин-332 (ламинин 5) – самые распространенные ламинины в развивающейся и взрослой коже. Оба секретируются кератиноцитами и накапливаются в зоне БМ, окружающей ВФ. Кроме того, ламинин-511 стимулирует рост ВФ (Sugawara et al., 2007). Ламинин-332 и ламинин-511 могут связываться с интегринами $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ и $\alpha 6\beta 4$ (Cognato, Yurchenco, 2000; Kikkawa et al., 2000; DeRouen et al., 2010). Однако, для стабильности контакта кератиноцитов с БМ самой критичной является связь ламинина с интегрином $\alpha 6\beta 4$. Мыши с делецией субъединиц интегрин $\alpha 6$ или $\beta 4$ умирают вскоре после рождения, у них возникают многочисленные волдыри (блистеринг) на коже и в стратифицированном плоском эпителии, обусловленные отсутствием гемидесмосом (Dowling et al., 1996; Georges-Labouesse et al., 1996; van der Neut et al., 1996). Мутации ламинина-332 также связаны с блистерингом и вызывают заболевание, известное как буллезный эпидермолиз (пузырчатка). В отсутствие ламинина-332 эпидермальная адгезия сильно нарушается и при буллезном эпидермолизе Херлица может привести к летальному исходу (Kivirikko et al., 1995).

Особый интерес вызывает роль ламинина-511 в морфогенезе ВФ. В коже от нокаутированных по ламинину-511 мышей, трансплантированной иммунодефицитным мышам Nude, ВФ останавливаются в развитии на стадии зачатка. При этом экзогенный ламинин-511 восстанавливает развитие ВФ в данных трансплататах. Также было выявлено, что ингибирование ламинина-511 вызывает потерю волос в полнослойных ксенотрансплататах эмбрионального скальпа человека уже после 3-х дней инъектирования блокирующими антителами (Li et al., 2003). Результаты исследований показали, что для инвагинации ВФ требуется взаимодействие ламинина-511 именно с эпителиальным интегрином $\beta 1$, а не с интегрином $\beta 1$ в клетках ДП (DeRouen et al., 2010).

I.10. АПИКО-БАЗАЛЬНАЯ АСИММЕТРИЯ БАЗАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ

БМ определяет полярность базальных кератиноцитов. Поляризация выражается в неоднородном распределении мембранных белков базальных кератиноцитов и асимметрии макромолекул плазматической мембраны. В клетке базального кератиноцита выделяют два мембранных домена: апикальный и базолатеральный. Последний граничит с БМ. Это свойство базальных кератиноцитов называют апико-базальной асимметрией. Поляризованное состояние эпителиальных клеток достигается распределением и сохранением белков в области апикального или базолатерального мембранного домена.

Известно, по крайней мере, несколько механизмов поддержания распределения белков в апикальном или базолатеральном домене, в частности, плотные контакты и мембранные белки. Плотные контакты действуют как молекулярные барьеры на границе апикального и базолатерального доменов. Они препятствуют свободной диффузии белков из одного домена в другой, и реализуют только диффузию ионов и малых молекул (Cereijido et al., 1998). Несколько классов мембранных белков связываются с цитоплазматическим комплексом анкирин-спектрина на базолатеральной мембране, в том числе ионные транспортеры и каналы. Эти взаимодействия важны в регуляции движения мембранных белков и стабилизации разных мембранных доменов (Bennett, Healy, 2008).

Поляризованное состояние базального кератиноцита влияет на детерминацию дочерних клеток после деления материнской клетки. В результате симметричных митозов образуются одинаково детерминированные клетки. Тогда как в результате асимметричных делений детерминанты распределяются в клетках неравномерно. Стратификация эпидермиса происходит в значительной мере за счет асимметричных митозов, последующего открепления клеток от БМ и перемещения в супрабазальный слой. Симметрию деления клеток в базальном слое эпидермиса определяют по ориентации веретена деления относительно БМ (рис. 20). При асимметричном делении веретено деления клетки ориентировано перпендикулярно плоскости БМ. При симметричном делении ось веретена деления располагается параллельно БМ (Lechler, Fuchs, 2005). Кратковременное мечение прогениторных базальных кератиноцитов показало, что в результате

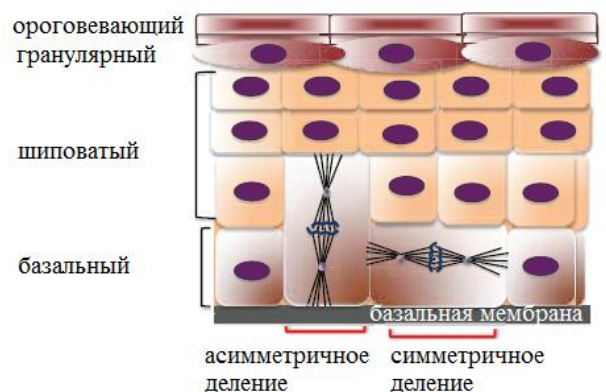


Рисунок 20. Ориентация веретена деления при стратификации эпидермиса (по Ray, Lechler, 2011)

деления клетки, у которой ось веретена деления была перпендикулярна БМ образуется одна базальная клетка, экспрессирующая кератин 14 и одна супрабазальная клетка, экспрессирующая кератин 10 (Poulson, Lechler, 2010). Это напрямую коррелирует с определением судьбы клеток в результате асимметричных делений. БМ является нишей для прогениторных кератиноцитов и удаление клеток из этой ниши, которое происходит при асимметричном делении, по-видимому, также играет значительную роль в определении судьбы клеток. Интегриновые рецепторы связывают клетки с БМ и способствуют сохранению пролиферативного статуса базальных кератиноцитов (Fuchs, Raghavan, 2002; Watt, 2002).

Белковый комплекс, ориентирующий веретено деления базальных кератиноцитов мыши включает: mInsc (мышинный гомолог Inscuteable); NuMa (Nuclear mitotic apparatus protein), белок, связывающийся с микротрубочками и локализующийся в полюсах веретена деления; LGN и белки Par, партнеры, связывающие mInsc; aPKC (атипичная протеинкиназа C), необходимая для установления апикального домена поляризованного эпителия (рис. 21) (Lechler, Fuchs, 2005).

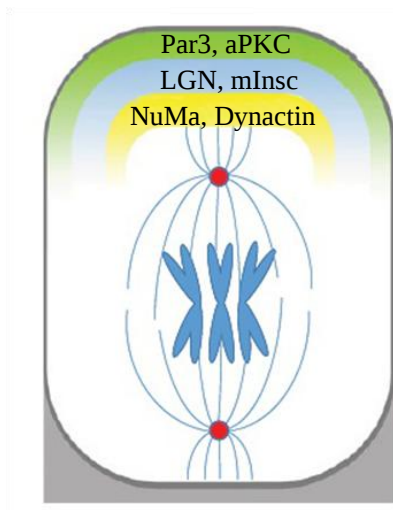


Рисунок 21. Белковый комплекс ориентации веретена деления (по Kulukian, Fuchs, 2013)

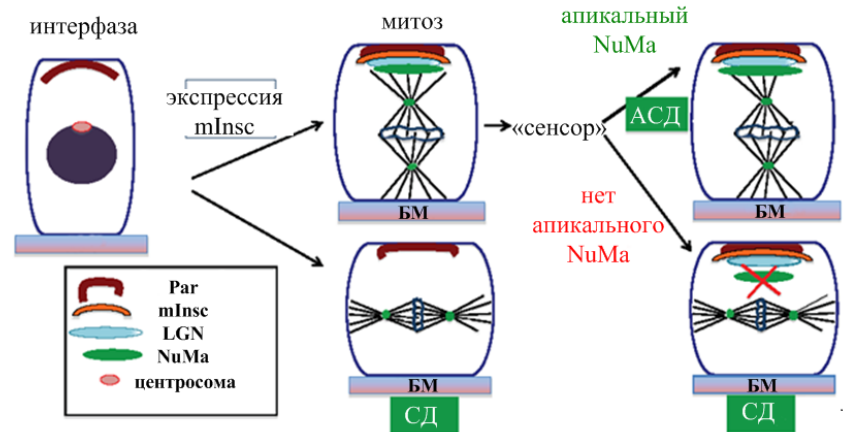


Рисунок 22. Контроль ориентации веретена деления клетки.
СД – симметричное деление;
АСД – асимметричное деление (по Ray, Lechler, 2011)

Поляризация клеток и инициация асимметричных делений связана с организацией mInsc, LGN и Par3 в форме серпа на апикальном домене клеток (рис. 22). *In vivo* локализация серпа mInsc, LGN и Par3 всегда перпендикулярна БМ и интегрину $\beta 4$, организаторам гемидесмосом. *In vitro* в культивируемых клетках на стадии митоза mInsc, LGN и Par3 локализируются асимметрично, а в покоящихся клетках распределяются диффузно, располагаясь в межклеточных контактах (Lechler, Fuchs, 2005). БМ и интегрин $\beta 1$ необходимы для распределения комплекса LGN и правильной ориентации веретена деления. α -катенин является

важным для апикального привлечения aPKC и для сборки апикального серпа LGN-mInsc-Par3 (Lechler, Fuchs, 2005). Механизмы, управляющие ориентацией веретена деления перпендикулярно БМ при асимметричных митозах, сложные и регулируются на разных уровнях (Poulson, Lechler, 2010). Ориентации веретена деления перпендикулярно БМ способствуют белки mInsc и LGN, которые обеспечивают связь апикального домена с апикальным полюсом веретена деления (Lechler, Fuchs, 2005; Poulson, Lechler, 2010). Однако исследования длительной экспрессии mInsc (Poulson, Lechler, 2010) предполагают следующее: 1) апикальный комплекс mInsc и LGN может быть не связан с ориентацией веретена деления; 2) ключевым регуляторным моментом перпендикулярной ориентации веретена деления при асимметричном делении является сохранение экспрессии NuMA в апикальном кортексе клетки; 3) базальные клетки обладают механизмами, которые реагируют на дисбаланс ориентации деления, предотвращая негативные последствия и обеспечивая оптимальное соотношение между асимметричным и симметричным делением клеток (рис.22). Молекулярная природа таких «сенсоров» на настоящее время не изучена (Poulson, Lechler, 2010; Ray, Lechler, 2011). Также мало что известно о процессах симметричного деления эпидермальных клеток.

I.11. ИНТЕГРИНЫ В ФОРМИРОВАНИИ И ГОМЕОСТАЗЕ ЭПИДЕРМИСА И ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ

Интегрины – это нековалентно связанные гетеродимерные трансмембранные рецепторы, состоящие из α - и β -субъединиц, которые образуют функциональный рецептор. В настоящее время известно 18 α - и 8 β -субъединиц интегринов позвоночных. Эти 26 субъединиц при взаимодействии образуют по меньшей мере 24 комбинации $\alpha\beta$ -рецепторов (рис. 23) (Hynes, 2002; Barczyk et al., 2010).

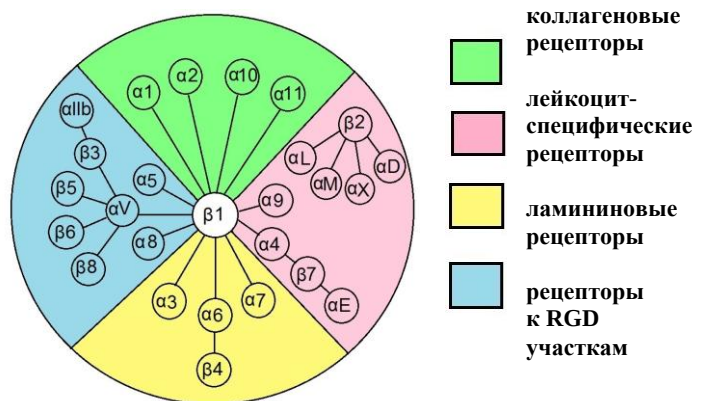


Рисунок 23. Семейство гетеродимерных интегриновых рецепторов (по Hynes, 2002; Barczyk et al., 2010 с изменениями)

В эпидермисе наиболее распространены интегрины $\alpha 3\beta 1$ (преимущественно рецептор ламинина-332), $\alpha 6\beta 4$ (компонент гемидесмосом, рецептор ламинина-332) и $\alpha 2\beta 1$ (рецептор коллагена и ламинина) (Adams, Watt, 1991). Интегрин $\alpha v\beta 5$ (рецептор витронектина) также

является основным эпидермальным интегрином, но он экспрессируется слабее, чем другие интегрины (Hertle et al., 1991). Кроме того, базальные кератиноциты эпидермиса экспрессируют интегрины $\alpha 5\beta 1$ (рецептор фибронектина) и $\alpha 9\beta 1$ (рецептор тенасцина C) (Adams, Watt, 1990; Palmer et al., 1993). Группа $\beta 1$ -интегринов приурочена, в основном, к базальной поверхности кератиноцитов (Adams, Watt, 1991; Hertle et al., 1991; Jensen et al., 1999) и участвует в формировании фокальных контактов. Интегрин $\alpha 3\beta 1$ обнаруживается как на базальной, так и на латеральной поверхности базальных кератиноцитов, где он может участвовать в межклеточных контактах (Hashmi, Marinkovich, 2011). В норме в эпидермисе экспрессия интегринов ограничена базальным слоем и наружным корневым влагалищем ВФ, за исключением интегрин $\alpha \nu \beta 8$, обнаруженного в супрабазальных слоях кожи век у мышей (Step, 1999). При заживлении ран и при таких патологических состояниях, как псориаз и опухолевая трансформация, интегрины экспрессируются супрабазальными кератиноцитами (Watt, 2002). Эктопическая экспрессия интегринов $\alpha 2$, $\alpha 5$ и $\beta 1$ в супрабазальных слоях кожи трансгенных мышей приводит к гиперпролиферации, нарушению дифференцировки и псориазоподобному фенотипу (Carroll et al., 1995).

Основным интегрином, обеспечивающим прочную связь эпидермиса с дермой, является интегрин гемидесмосом $\alpha 6\beta 4$ (Dowling et al., 1996; Georges-Labouesse et al., 1996; van der Neut et al., 1996). Помимо интегрин $\alpha 6\beta 4$, связь с БМ в коже обеспечивают интегрины, в состав которых входит субъединица $\beta 1$. В отличие от нокаута генов субъединиц $\alpha 6$ или $\beta 4$, полный нокаут генов интегринов $\beta 1$ приводит к ранней внутриутробной гибели, что делает невозможным определение его роли в коже (Fassler, Meyer, 1995; Stephens et al., 1995).

Разработка технологии получения мышей с тканеспецифическим нокаутом генов позволила избежать трудностей с изучением мутаций, приводящих к внутриутробной гибели эмбрионов. Чтобы изучить последствия эпидермис-специфичной делеции интегринов $\beta 1$, мышей с фланкированными LoxP-сайтами аллелями гена субъединицы $\beta 1$ скрещивали с мышами, экспрессирующими Cre-рекомбиназу под контролем промоторов генов кератина 14 или 5, которые активируются в базальном слое эмбрионального эпидермиса (Raghavan et al., 2000; Brakebusch et al., 2000). У потомства этих мышей наблюдали эпидермальный блистеринг, но менее выраженный, чем при нокауте субъединиц $\alpha 6$ или $\beta 4$.

В тонкой и хрупкой коже мышей с эпидермис-специфическим нокаутом субъединиц $\beta 1$ (Cre-рекомбиназа под контролем промотора кератина 14) отмечено почти полное отсутствие БМ, нестабильность гемидесмосом, резкое снижение пролиферативного потенциала эпидермиса, неспособность развивающихся ВФ инвагинировать в дерму. Мышата обычно умирали через несколько часов после рождения, вероятно, из-за отсутствия эпидермального барьера и дегидратации. Тем не менее, программа терминальной дифференцировки

кератиноцитов у животных не изменялась (Raghavan et al., 2000), что противоречило выводам, сделанным в работах с использованием трансфекции мутантных субъединиц $\beta 1$ в культуре и исследований суспензионных культур кератиноцитов (Levy et al., 2000; Hotchin et al., 1995). Полученные результаты указывают на решающую роль интегринов, содержащих субъединицу $\beta 1$, в поддержании пролиферативного потенциала развивающегося эпидермиса (Raghavan et al., 2000). Интересной представляется неспособность развивающихся ВФ инвагинировать в дерму. Молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса инвагинации растущего ВФ и ремоделирования им ВКМ, изучены недостаточно. Очевидно, что не последнюю роль в нем играют интегрины, в частности, содержащие субъединицу $\beta 1$.

В другой работе также получены мыши с нокаутом генов субъединиц $\beta 1$ в коже эмбрионов (ген Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена кератин 5). Эти мыши оставались жизнеспособными в течение 4–6 нед (Brakebusch et al., 2000), и к этому времени полностью утрачивали ВФ. У мутантных мышей развивались аномалии ВФ и прогрессирующая потеря волос из-за снижения пролиферации клеток матрикса волоса. В итоге деформированные ВФ замещались инфильтратом макрофагов, эпидермис кожи спины утолщался, базальный слой эпидермиса был дезорганизованным, клетки имели аномальную морфологию, наблюдались нарушения в формировании БМ, снижалось количество гемидесмосом, развивался блистеринг. В отличие от предыдущего исследования, наблюдалось увеличение числа слоев дифференцированных кератиноцитов в эпидермисе. Целостность БМ, окружающей ВФ, не нарушалась, возможно, из-за меньшего механического напряжения, чем в межфолликулярном эпидермисе или меньшей зависимости структуры БМ вокруг ВФ от интегринов $\beta 1$. В конечном итоге развивался дермальный фиброз (Brakebusch et al., 2000). Наблюдалось также снижение пролиферативного потенциала кератиноцитов, но, как справедливо замечают, это может быть вызвано не непосредственным отсутствием субъединицы $\beta 1$, а, например, сопутствующим снижением экспрессии интегрин $\alpha 6\beta 4$.

Полученные в обоих исследованиях результаты изучения последствий удаления интегринов $\beta 1$ в эмбриональном эпидермисе указывают на важную роль интегринов $\beta 1$ в формировании ВФ, организации БМ, пролиферации и дифференцировке кератиноцитов. Известно, что при удалении интегринов $\beta 1$ ВФ не способны к циклическим изменениям и дегенерируют, поэтому предполагается, что интегрины $\beta 1$ участвуют в поддержании компартмента СК или активации СК при инициации стадии анагена (Brakebusch et al., 2000). Однако результаты эпидермис-специфического нокаута генов интегринов $\beta 1$ различались в зависимости того, какой тканеспецифический ген (*Krt5* или *Krt14*) использовали для активации Cre-рекомбиназы. Некоторые мыши с тканеспецифическим нокаутом интегринов $\beta 1$ в

эпидермисе жили достаточно долго. Это позволяло провести эксперименты по заживлению ран, которые подтвердили, что $\beta 1$ необходим для миграции кератиноцитов (Grose et al., 2002).

Индукцируемая в эмбриогенезе эпидермис-специфическая делеция гена интегрина $\beta 1$ (Raghavan et al., 2000; Brakebusch et al., 2000) не позволяла полностью оценить ее влияние на программы пролиферации, дифференцировки, развития и поддержания ВФ из-за развивающегося фиброза, воспалительного процесса или смерти животных. Чтобы отличить первичные последствия нокаута субъединицы $\beta 1$ от вторичных, сравнили последствия нокаута гена интегрина $\beta 1$ в эпидермисе на 14.5 сут эмбриогенеза мыши (с помощью Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 5 – K5Cre $\beta 1$ null) и индуцированной делеции во взрослом эпидермисе (с помощью 4-гидрокситамоксифена и CreER-рекомбиназы под контролем промотора гена кератина 14 – K14CreER) (Lopez-Rovira et al., 2005). В первом случае (K5Cre $\beta 1$ null) наблюдали увеличение количества слоев дифференцированных клеток, дегенерацию ВФ, сальных желез, снижение пролиферации, отделение эпидермиса от подлежащей дермы. У этих животных обнаружили аномальное накопление коллагена типа IV и ламинина-332 в дерме. Удаление субъединицы $\beta 1$ интегрина в эмбриональном эпидермисе (K5Cre $\beta 1$ null) вызывало нарушение терминальной дифференцировки, приводило к увеличению слоев клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для дифференцированных кератиноцитов (кератин 10, корнифин, лорикрин и трансглутаминаза 1). Это противоречит данным, которые свидетельствуют в пользу сохранения программы дифференцировки эпидермальных клеток у мышей с тканеспецифическим нокаутом интегрина $\beta 1$ (Raghavan et al., 2000). Сохранившиеся ВФ все еще экспрессировали маркеры СК на высоком уровне. Во втором случае удаление $\beta 1$ в эпидермисе взрослых животных (K14CreER) привело к незначительным изменениям в эпидермисе. Основной аномалией было увеличение количества меланоцитов. Также наблюдалось нарушение дифференцировки межфолликулярного эпидермиса, уменьшение размеров сальных желез. ВФ сохранялись, но наружные корневые влагалища ВФ были увеличены, луковицы некоторых ВФ были тонкими и продолговатыми, в некоторых областях межфолликулярного эпидермиса обнаружено значительное количество пролиферирующих клеток. На 30-й день после обработки гидрокситамоксифеном сохранялась высокая экспрессия маркеров СК в зоне БЖ. Фенотипические изменения, наблюдаемые при удалении интегринов $\beta 1$ в зрелом эпидермисе, были гораздо менее выраженными, чем при удалении во время внутриутробного развития. В обоих случаях отсутствовали очевидные изменения в компартменте СК ВФ (Lopez-Rovira et al., 2005).

Поскольку описанные модели животных с различными дефектами экспрессии субъединиц $\beta 1$ не учитывали вклад конкретных α -субъединиц интегринов в регуляцию, изучили, как влияет отсутствие интегрина $\alpha\beta 1$ на зрелую кожу и развитие ВФ (Conti et al.,

2003). Интегрин $\alpha 3\beta 1$ обильно экспрессируется в коже, *in vivo* он локализован между гемидесмосомами и связывает БМ с актиновым цитоскелетом. Инактивация $\alpha 3$ -субъединицы интегрина приводила к смерти мышат вскоре после рождения, у животных наблюдались дефекты развития почек и легких (Kreidberg et al., 1996). У новорожденных $\alpha 3$ null-мышей на подушечках стоп появлялись пузыри, при этом структура гемидесмосом оставалась нормальной. Анализ экспрессии ламинина-332 выявил области дезорганизации зоны БМ. Программа дифференцировки и стратификации эпидермиса не изменялась (DiPersio et al., 1997). Позднее установили, что ни интегрин $\alpha 3\beta 1$, ни $\alpha 6\beta 4$ не существенны для морфогенеза и гомеостаза эпидермиса в ходе развития кожи, если эпидермис остается прикрепленным к дерме. Мышиные эмбрионы, у которых отсутствовали данные интегрин, имели нормальную программу пролиферации и частоту апоптоза в местах сохранения целостности БМ до момента образования пузырей (DiPersio et al., 2000). Важным был контакт между эпидермисом и дермой, который непродолжительное время обеспечивался неизвестным компенсаторным механизмом. По мере развития блистеринга в ходе эмбриогенеза интенсивность апоптоза возрастала. К сожалению, морфогенез ВФ при удалении интегринов $\alpha 3\beta 1$ или $\alpha 6\beta 4$ не обсуждается (DiPersio et al., 2000). Для дальнейшего изучения последствий удаления интегрин $\alpha 3\beta 1$ кожу новорожденных животных с нокаутом этого интегрин пересадили бестимусным мышам. В зрелых трансплантатах наблюдались нарушение организации БМ в межфолликулярном эпидермисе и возникновение серьезных аномалий морфологии ВФ после первого цикла развития: задержка роста ВФ, дезорганизация F-актина в ВФ, фрагментация ВФ, отклонения в накоплении пигмента и образование кластеров ВФ. Пристальное изучение этих трансплантатов позволило сделать вывод о том, что интегрин $\alpha 3\beta 1$ не является обязательным для дифференцировки зрелого межфолликулярного эпидермиса, но необходим для регуляции различных процессов морфогенеза и поддержания ВФ. При делеции интегрин $\alpha 3\beta 1$ зрелая кожа может полностью развиваться и формировать ВФ и сальные железы, поэтому, по всей видимости, интегрин $\alpha 3\beta 1$ не является необходимым для поддержания эпидермальных СК. Однако, после первого цикла в ВФ возникают значительные нарушения, снижается пролиферация и апоптоз, что свидетельствует о продолжительном пребывании ВФ в фазе покоя, а образующиеся кластеры могут отражать безуспешные попытки ВФ вступить в следующую фазу роста. Эти данные показывают, что интегрин $\alpha 3\beta 1$ играет важную роль в специфической регуляции морфологии ВФ в течение фазы катагена цикла ВФ (Conti et al., 2003).

Учитывая данные о роли интегринов $\beta 1$ в формировании и поддержании ВФ, пролиферации и дифференцировке кератиноцитов, структуризации БМ, вероятном участии в поддержании или активации популяции СК, можно предполагать, что у мышей в результате

активации интегриновых рецепторов $\beta 1$, как минимум, меняется экспрессия ключевых генов, вовлеченных в развитие и формирование ВФ. Фенотипические проявления, наблюдаемые при инактивации этих генов, сходны с фенотипом, обусловленным нокаутом генов интегринов $\beta 1$.

Обнаружено, что некоторые факторы транскрипции, такие, как *hairless*, комплекс β -катенин-LEF1-TCF1 или SHN, вовлечены в пролиферацию кератиноцитов матрикса волоса и зачатков ВФ (Panteleyev et al., 1999; Oro, Scott, 1998). Фенотип мутаций, ведущих к инактивации этих белков, частично схож с фенотипом $\beta 1$ -null ВФ. У мышей с мутацией *hairless* приблизительно на 15-й день после рождения происходит преждевременный апоптоз кератиноцитов матрикса волосяной луковицы наряду с увеличением скорости пролиферации, наблюдается неправильное расположение внутреннего корневого влагалища и атрофия наружного влагалища. Наружное корневое влагалище и волосяная луковица распадаются на отдельные кластеры клеток (Panteleyev et al., 1999). У мышей с инактивацией гена *Lef1* отсутствуют вибриссы и ВФ (van Genderen et al., 1994), как и у мышей с эпидермис-специфичным нокаутом гена интегрин $\beta 1$. В трансплантатах кожи мышей *Shh*^{-/-}, пересаженных иммунодефицитным мышам, нарушена дифференцировка и формируются гиперпролиферативные фолликулоподобные структуры, которые не способны продуцировать зрелые стержни волос (St-Jacques et al., 1998; Chiang et al., 1999).

Интегриновые рецепторы сочетают функции механического прикрепления клеток к субстрату и двунаправленной сигнализации. Они, с одной стороны, обеспечивают адекватную реакцию клетки на сигналы среды, а с другой – позволяют клетке самой модулировать свое микроокружение. В эпидермисе адгезия базальных клеток к БМ критична для прочного соединения эпидермиса с дермой, поддержания гистотипической структуры эпидермиса и выполнения им защитных функций. Однако этим функции интегринов не исчерпываются. Помимо участия в сборке белков БМ, интегрины осуществляют контроль ориентации митотического веретена и апикальной локализации белкового комплекса при асимметричном делении базальных кератиноцитов, способствуя непрерывной регенерации эпидермиса и поддержанию пула базальных кератиноцитов. Регулируя миграцию, пролиферацию и дифференцировку эпидермальных клеток, интегрины в конечном счете во многом определяют морфогенез кожи и ее придатков. Нарушение экспрессии интегринов приводит к задержке развития ВФ в эмбриогенезе или к деградации фолликулов и потере волос во взрослом состоянии. Нарушения в экспрессии интегринов могут лежать в основе многих патологических состояний, в том числе малигнизации (Риппа и др., 2013).

1.12. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ПАТОЛОГИИ ВОЛОС И ИХ МОДЕЛИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Гомеостаз ВФ включает процесс закладки, дифференциации, пролиферации, формирования полноценной структуры стержня волоса и регенерации в течение жизни. Эта сложная биологическая система управляется работой множества генов. По некоторым данным насчитывают около 100 генов, экспрессирующихся только в стержне волоса (Powell et al., 1991; Rogers, Powell, 1993). Известны мутации некоторых из генов, которые являются причиной развития наследственных дерматозов и часто вызывают потерю волос.

Генетические заболевания, ведущие к потере волос разделяют на 2 группы: синдромные (фенотип волос как часть синдрома) и несиндромные (только фенотип волос). Большинство болезней волос являются синдромными. Знания генетического фона заболеваний волос позволяют облегчить раннюю диагностику и выбор терапии для пациентов с врожденными заболеваниями волос.

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) – интернет-вариант базы данных проекта «Менделевское наследование у человека» (Mendelian Inheritance in Man, MIM). OMIM является всеобъемлющим, официальным справочником человеческих генов и фенотипов генетических заболеваний человека, находится в свободном доступе и обновляется ежедневно. OMIM создан и редактируется на базе Университета Джона Хопкинса (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine). Официальный сайт omim.org.

Сигнальный путь EDA/EDAR/EDARADD. Гипогидротическая эктодермальная дисплазия (HED) – наследственное заболевание, которое выражается в отсутствии или гипоплазии (аномальном развитии) волос, зубов, эккринных потовых желез. В большинстве случаев, HED имеет X-сцепленный рецессивный тип наследования (OMIM 305100), в меньшинстве случаев HED наследуется как аутосомно-доминантный (OMIM 129490) или рецессивный признак (OMIM 224900). Было показано, что X-сцепленный рецессивный тип наследования HED вызван мутацией в гене *Eda* (Kere et al., 1996; Bayes et al., 1998; Monreal et al., 1998), тогда как аутосомные формы HED вызваны мутациями в гене *Edar* (Monreal et al., 1999) или *Edaradd* (Headon et al., 2001; Bal et al., 2007). Заболевание HED развивается в результате нарушения сигнального пути EDA/EDAR/EDARADD и мутации в любом из этих трех компонентов приводят к развитию одинаковых фенотипических характеристик среди пациентов с HED. Фенотип заболевания подобен фенотипу мутантных мышей *Tabby/Sleek/downless/crinkled*. Исследования показали, что фенотип *Tabby* определяется X-сцепленной рецессивной мутацией в гене *Eda* (Ferguson et al., 1997; Srivastava et al., 1997), *Sleek* и *downless*, соответственно,

аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной мутацией в гене *Edar* (Headon, Overbeek, 1999), а *crinkled* – аутосомно-рецессивной мутацией в гене *Edaradd* (Headon et al., 2001). Фенотип мышей со спонтанными мутациями *Sleek*, *downless*, и *crinkled* аналогичен фенотипу мутантных мышей *Tabby*.

Ген Hairless. Атрихия (облысение) с узелковыми поражениями (Atrichia with papular lesions, APL) (APL; OMIM 209500) – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, также известное как врожденная алопеция (congenital alopecia universalis) (OMIM 203655). APL характеризуется полной потерей волос (атрихия) после первого катагена и развитием сгруппированных дермальных кист в дальнейшем. Фенотип мутантных мышей *hairless* с аутосомными рецессивными мутациями в гене *hairless* (*Hr*) аналогичен фенотипу людей с APL. Мутантные мыши *hairless* как модель алопеции известны с 1926 года (Brooke, 1926). Развитие ВФ у мутантов происходит нормально, но вскоре после рождения волосы выпадают и новые никогда не вырастают. Гистологически деструкция ВФ выражается в дезинтеграции эпителиальных клеток ВФ в катагене. Клетки ВФ не способны контактировать с ДП, которая в свою очередь распадается на кластеры клеток и образует дермальные кисты (Panteleev et al., 1999). Анализ мутантов *hairless* показал, что правильная работа гена *Hr* регулирует стадию катагена и сохраняет способность ВФ вступить в следующий цикл регенерации (Panteleev et al., 1999). Поскольку аминокислотные последовательности гена *HR* человека и мыши высоко гомологичны, предполагается высокая консервативность и важное функциональное значение гена *HR*.

Marie Unna hypotrichosis (MUN; OMIM 146550) – несиндромное наследственное заболевание волос с аутосомно-доминантным типом наследования. У людей с MUN обычно редкие волосы на голове и лице при рождении. В подростковом возрасте начинается активное выпадение волос, это приводит к почти тотальной алопеции, которая по фенотипу напоминает андрогенную алопецию. Мутация MUN картируется на хромосоме 8p21 поблизости с геном *HR*, хотя при прямом анализе нуклеотидной последовательности кодирующих областей гена *HR* обнаружить мутации не удалось (van Steensel et al., 1999; Lefevre et al., 2000; Sreekumar et al., 2000). Позже выяснилось, что MUN вызывает мутация в одной из рамок считывания 5' некодирующей области гена *Hr* (U2HR) (Wen et al., 2009). Подобные мутации в области U2HR гена *Hr* были обнаружены у мутантных мышей *hairpoor* и *HrN* (*near-naked mouse*). По результатам исследований можно предположить, что молекулярный механизм развития MUN, фенотипа мышей *hairpoor* и *HrN* наиболее сопоставим с мутацией, которая приводит к изменению продукта гена *Hr* таким образом, что он приобретает новые патологические функции (gain-of-function mutation) (Kim et al., 2010; Baek et al., 2009; Wen et al., 2009).

Ген Foxn1 и гены кератинов волос. Врожденным Т-клеточным иммунодефицитом, алопецией и дистрофией ногтей страдают пациенты с мутациями в гене *Foxn1/Whn* (OMIM 601705). У этого заболевания аутосомно-рецессивный тип наследования. Фенотип заболевания подобен фенотипу мышей *Nude* (Nehls et al., 1998; Frank et al., 1999). FOXN1 – транскрипционный фактор, регулятор экспрессии генов кератинов стержня волоса (Schlake et al., 2000).

Мутации в трех генах кератинов типа II, *Krt81*, *Krt86* (Winter et al., 1997), и *Krt83* (van Steensel et al., 2005) являются причиной гипотрихоза с аутосомно-доминантным типом наследования, известного как *monilethrix* (OMIM 158000). Заболевание характеризуется особой аномалией стержней волос – «бусоподобные» волосы, что приводит к их ломкости. Все три кератина преимущественно экспрессируются в зоне кератинизации кортекса волос, где активно происходит ороговение стержня волоса (Langbein et al., 2001). Было показано, что мутации гена кератина типа II, *KRT74* вызывают наследственное заболевание (autosomal dominant woolly hair (ADWH); OMIM 194300), с аутосомно-доминантным типом наследования (Shimomura et al., 2010). Фенотип волос при данном заболевании – аномально тугие курчавые волосы, дефицит роста волос. Ген *Krt74* кодирует кератин 74, который преимущественно экспрессируется в наружном корневом влагалище (слое Huxley) (Langbein et al., 2003). Помимо гена *KRT74* у человека на хромосоме 12 (12q13), располагаются гены *Krt71*, *Krt72*, *Krt73* и паттерн их экспрессии хорошо охарактеризован также в наружном корневом влагалище (Langbein et al., 2003). Позже была обнаружена мутация в гене *Krt71* в японской семье с ADWH (Fujimoto et al., 2012). Этот факт подтверждает, что молекулярная основа многих наследственных заболеваний волос до сих пор полностью не определена. Некоторые мутации в гене *Krt71* найдены у мутантных мышей *Ca* (*Caracul*), которые имеют волнистый шерстный покров (Kikkawa et al., 2003) и мутантных мышей *Rco3* (*Reduced coat 3*) с прогрессирующей алопецией (Peters et al., 2003).

Классические кадгерины. Рecessивно наследуемые мутации в гене *Cdh3*, кодирующем белок Р-кадгерин, вызывают два врожденных заболевания у человека. Мутации в гене *Cdh3* были определены в семьях с гипотрихозом и ювенольной макулярной дистрофией (juvenile macular dystrophy (HJMD); OMIM 601553). Заболевание характеризуется развитием редких волос и ранней слепотой вследствие макулярной дистрофии сетчатки (Sprecher et al., 2001). Более того, было обнаружено, что синдром ЕЕМ – эктодермальная дисплазия, эктодактилия и макулярная дистрофия (ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and macular dystrophy (EEM); OMIM 225280) также вызывается мутациями в гене *Cdh3* (Kjaer et al., 2005). Люди с синдромом ЕЕМ и синдромом HJMD имеют общий фенотип волос и глаз. Однако люди с синдромом ЕЕМ также имеют дополнительные аномалии в виде врожденного порока расщепления кистей рук или

стоп. Это обстоятельство предполагает ключевую роль Р-кадгерина в развитии не только волос и сетчатки глаз, но и конечностей у людей. На сегодняшний день, гены, контролирующие экспрессию Р-кадгерина, остаются в значительной степени неизвестными. Стоит отметить, что мутации в гене *p63* также вызывают наследственные заболевания, такие как эктодермальная дисплазия, эктодактилия, заячья губа/волчья пасть (ЕЕС; OMIM 129900) с аутосомно-доминантным типом наследования, развитие редких волос и врожденного порока расщепления кистей рук или стоп как у человека (Celli et al., 1999), так и у мыши (Mills et al., 1999, Yang et al., 1999). Фенотип этих заболеваний перекрывается с фенотипом мутаций в гене *Cdh3*. Было показано, что экспрессия Р-кадгерина и *p63* перекрывается не только в плакоде ВФ, но и в зачатках конечностей эмбриона мыши (Shimomura et al., 2008). Р-кадгерин является геном мишенью *p63* и играет решающую роль в развивающихся ВФ и зачатках конечностей у человека (Shimomura et al., 2008).

Компоненты десмосом. Одними из главных структурных компонентов десмосом являются десмосомные кадгерины: десмоглеины (DSG) и десмоколлины (DSC). У человека известно 4 типа десмоглеинов (DSG1-DSG4) и три типа десмоколлинов (DSC1-DSC3).

Десмоглеины (DSG). Было показано, что мутантные мыши *bal* (*balding*), несущие мутацию в гене *Dsg3* имеют четко выраженную алопецию (Sundberg et al., 1998). Возможно, мутации в гене *Dsg3* могут также вызывать наследственные заболевания волос у людей. Но пока, аналога фенотипу *bal* мышей у людей обнаружено не было. В норме DSG3 экспрессируется в медулле стержня волоса. Мутация в гене *DSG4* обнаружена у мутантных мышей *lah* (*'lanceolate hair'*). Эта мутация имеет аутосомно-рецессивный тип наследования, вызывает алопецию и ломкость стержней волос аномальной структуры (Montagutelli et al., 1996; Kljuic et al., 2003). В норме DSG4 экспрессируется в супрабазальных слоях эпидермиса и ВФ. Также мутация в гене *Dsg4* обнаружена у людей с врожденным несиндромным гипотрихозом (OMIM 607903), который наследуется по аутосомно-рецессивному типу. У нескольких пациентов с *monilethrix* с аутосомно-рецессивным типом наследования также были определены мутации в гене *Dsg4* (Schaffer et al., 2006; Shimomura et al., 2006; Zlotogorski et al., 2006).

Десмоколлины (DSC). В работе Ayub был описан гипотрихоз (*hypotrichosis and recurrent skin vesicles* (HRSV); OMIM 613102) с аутосомно-рецессивным типом наследования (Ayub M. et al., 2009). У людей с этим заболеванием редкие волосы на голове с хрупкими стержнями, везикулы на коже головы и тела распределены диффузно. Везикулы спонтанно исчезают и вновь появляются. Заболевание было сопоставлено с кластером генов *Dsg-Dsc* на хромосоме 18q12.1, и, впоследствии, в семье с HRSV определена мутация в гене *Dsc3* (Ayub et al., 2009). Однако, наличие везикул в коже больных HRSV людей оспаривается (Payne, 2010). По-

видимому, фенотип вызванный мутацией *Dsc3* во многом пересекается с фенотипом мутаций в гене *Dsg4*.

Плакофилин (PKP). PKP1 слабо экспрессируется в базальном слое эпидермиса, усиленно в гранулярном и шиповатом слоях, но отсутствует в ороговевшем слое. PKP1 преимущественно экспрессируется в наружном корневом влагалище ВФ (Moll et al., 1997). Мутации *Pkp1* у животных пока не найдены. Однако у людей мутации в гене *Pkp1* вызывают наследственное заболевание (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome; OMIM 604536). Это заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу и характеризуется хрупкостью кожи, короткими редкими волосами на голове и дистрофией ногтей (McGrath et al., 1997). Электронно-микроскопические наблюдения эпидермиса пациентов с этим заболеванием продемонстрировали нарушение распределения десмоплакинов в цитоплазме и агрегацию кератиновых филаментов около ядер клеток (McGrath et al., 1997). Исследования кератиноцитов *PKP1*^{-/-}, полученных от пациентов, показали, что PKP1 влияет на размер и количество десмосом и миграцию кератиноцитов (South et al., 2003). Кроме того, биопсия кожи головы пациентов показала, что число ВФ на стадиях катагена-телогена увеличено, что отражает нарушение в цикле регенерации фолликулов (Bergman, Sprecher, 2005).

Плакоглобин и десмоплакин (DSP). Плакоглобин обнаружен как в десмосомах, так и в фокальных контактах. Плакоглобин необходим для десмосом миокарда. Нокаутированные по плакоглобину мыши умирают на E12-16 вследствие нарушений функции сердечной ткани. Дефектов развития кожи у этих мышей не было обнаружено из-за ранней внутриутробной смертности (Ruiz et al., 1996). У некоторых мутантных мышей, полученных на фоне генотипа мышей C57BL/6, которые доживали до рождения, развивался блистеринг кожи (Bierkamp et al., 1996). С плакоглобином взаимодействует десмоплакин (DSP). Эмбрионы мышей *DSP*^{-/-} не живут дольше E6.5. Эти данные показывают необходимость DSP для стабильности десмосом, уже начиная с раннего развития (Gallicano et al., 1998). Отсутствие DSP исключительно в эпидермисе при тканеспецифическом нокауте приводит к легкому снятию кожи животных при незначительном механическом стрессе (Vasioukhin et al., 2001). Мутации в гене плакоглобина *Jup* (junction plakoglobin, JUP) вызывают формирование курчавых волос у пациентов с заболеванием Naxos (OMIM 601214), сочетающим также признаки ладонно-подошвенной кератодермы и кардиомиопатии (McKoy et al., 2000). Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Также в некоторой семье с заболеванием Naxos определили гомозиготную мутацию в гене десмоколлина *Dsc2* (Simpson et al., 2009). Кроме того, рецессивные мутации в гене десмоплакина *Dsp* могут вызывать заболевание Carvajal syndrome (OMIM 605676) с симптомами, подобными Naxos (Norgett et al., 2000).

Корнеодесмозин (CDSN). При переходе гранулярного слоя кератиноцитов в роговой резко изменяется морфология десмосом. Плотное сцепление клеток рогового слоя эпидермиса во многом зависит от корнеодесмосом, видоизмененных десмосом рогового слоя (Simon et al., 2001). Дегградация корнеодесмосом считается главным событием процесса слущивания клеток. Корнеодесмозин (CDSN) вместе с десмоглеином 1 (DSG1) и десмоколлин 1 (DSC1) формирует корнеодесмосомы. CDSN экспрессируется в наружном корневом влагалище ВФ на поздних стадиях кератинизации, вероятно, играя роль в его терминальной дифференциации (Mils et al., 1992). Гетерозиготные мутации в гене *Cdsn* вызывают наследственное заболевание волос (hypotrichosis simplex of the scalp (HSS); OMIM 146520), которое характеризуется прогрессирующей потерей волос исключительно на голове. Гистологическое исследование ВФ таких пациентов показало, что наружное корневое влагалище волос нарушено, вокруг ВФ и в папиллярной дерме обнаружены агрегаты аномального CDSN. Было предположено, что эти агрегаты CDSN являются токсичными для клеток ВФ, а негативное взаимодействие мутантного белка CDSN с CDSN дикого типа может быть причиной потери сцепления в наружном корневом влагалище (Levy-Nissenbaum et al., 2003).

Липиды. Липиды синтезируются во внутреннем влагалище ВФ и выделяются на поверхность кутикулы стержня волоса. Липиды волоса обеспечивают структурную поддержку клеточным мембранам и защиту волоса в целом от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Лизофосфатидная кислота (LPA) является активным липидным медиатором с множеством биологических функций и играет важную роль в морфогенезе и регенерации ВФ (Takahashi et al., 2003). Ген липазы H, *Liph* кодирует фосфолипазу, которая катализирует продукцию лизофосфатидной кислоты (LPA). Мутации в гене *Liph* вызывают как гипотрихоз, так и заболевание курчавых волос (woolly hair; OMIM 604379). Заболевания наследуются по аутосомно-рецессивному типу. У пациентов с мутациями в гене *Liph* волосы растут медленно или рост волос останавливается, в результате чего формируются короткие стержни волос (Kazantseva et al., 2006; Ali et al., 2007; Nahum et al., 2009; Shimomura et al., 2009). Лизофосфатидная кислота (LPA) связывается с рецептором P2RY5, который кодируется геном *Lpar6* (Yanagida et al., 2009). И LIPH и LPAR6 обильно синтезируются во внутреннем влагалище ВФ и обеспечивают прочность стержня волоса. Мутации в гене *Lpar6* также вызывают развитие гипотрихоза и заболевания курчавых волос (woolly hair; OMIM 278150) (Petukhova et al., 2008; Shimomura et al., 2008a). Вариабельность фенотипов у пациентов с этими заболеваниями предполагает дополнительное влияние либо других генетических факторов, либо факторов окружающей среды.

Заболевания волос, вызванные нарушением сигнального пути Wnt/ β -катенин. Мутации в гене *Wnt10a* вызывают аутосомно-рецессивное заболевание (odonto-onycho-dermal dysplasia

(OODD); OMIM 257980), которое характеризуется различными эктодермальными нарушениями, включая гипотрихоз, гиподонтию, дистрофию ногтей и кератодермию (Adaimy et al., 2007).

Мутация в гене *Apcdd1* вызывает генерализованную форму простого гипотрихоза (hypotrichosis simplex). В норме APCDD1 обильно экспрессируется в эпителиальной и дермальной составляющей ВФ и является ингибитором сигнального пути WNT (Shimomura et al. 2010a). Кроме того *Apcdd1* вовлечен в развитие таких заболеваний, как андрогенетическая (Hillmer et al., 2008) и очаговая алопеция (Martinez-Mir et al., 2007).

Наследственный простой гипотрихоз (hypotrichosis simplex) имеет 2 формы: ограниченную скальпом (OMIM 146520) и генерализованную (OMIM 605389), когда заболеванию подвержены ВФ на всем теле. Это заболевание характеризуется дегенеративной миниатюризацией ВФ, при этом происходит замена терминальных волос на волосы веллус (Toribio, Quinones, 1974).

Таким образом, гипотрихоз – генетически гетерогенное заболевание. Это заболевание могут вызывать мутации в гене корнеодесмозина (*CDSN*) (OMIM 146520); кератина 74 (*Krt 74*) (OMIM 613981); регуляторной области гена *hairless* (*HR*) (OMIM 146550); десмоглеина 4 (*Dsg4*) (OMIM 607903); липазы Н (*Liph*) (OMIM 604379); рецептора P2RY5 (*Lpar6*) (OMIM 278150).

Открытие мутаций, вызывающих облысение, которые вовлечены в сигнальный путь WNT, имеет большое значение. Это доказывает, что характер роста волос у людей и у мышей имеет большее сходство, чем считалось ранее. Значение сигнального пути WNT в активации роста волоса на мышинных моделях доказано во многих экспериментах.

Очаговая алопеция. Диагноз очаговая алопеция (alopecia areata (AA); OMIM 104000) используется для описания любого фенотипа, который не проявляет классического наследования по Менделю и не наследуется как рецессивный или доминантный признак, связанный с одним локусом гена, но имеет очевидный генетический компонент. Генетическая предрасположенность к очаговой алопеции может изменяться под влиянием иммунных факторов, а развитие заболевания могут инициировать стрессовые воздействия (Irvine, Christiano, 2001). Очаговая алопеция имеет широкий спектр фенотипов от «пятнистого» выпадения волос на волосистой части головы до полной потери волос на всем теле, известным как универсальная алопеция (alopecia universalis). Гистологически, все типы очаговой алопеции характеризуются наличием диффузного инфильтрата лимфоцитов вокруг ВФ. Очаговая алопеция – тканеспецифическое аутоиммунное заболевание с неопределенным молекулярным механизмом. В норме ВФ иммуно-привилегированный орган, в котором молекулы главного комплекса гистосовместимости экспрессируются на низком уровне (Paus et al., 2005). Однако, при очаговой алопеции это условие нарушается, что приводит к деструкции ВФ лимфоцитами.

Полногеномное исследование, проведенное у семей с очаговой алопецией, выявило некоторые кандидатные локусы на хромосомах 6, 10, 16 и 18 (Martinez-Mir et al., 2007). Локус на хромосоме 6 соответствует главному комплексу гистосовместимости, что соотносится с мнением, что очаговая алопеция является аутоиммунным заболеванием. Область на хромосоме 18 содержит ген *Apcdd1* (Martinez-Mir et al., 2007). Эти данные показывают, что ген *Apcdd1* связан с патогенезом полигенных заболеваний волос.

У инбредных лабораторных мышей линии СЗН/HeJ во взрослом возрасте спонтанно развивается выпадение волос, которое напоминает возрастную очаговую алопецию у людей. На этой модели мышей было определено 4 предполагаемых локуса на хромосомах 8, 9, 15 и 17, при этом локус на хромосоме 17 соответствует ортологам антигенов гистосовместимости HLA (Sundberg et al., 2004).

Андрогенетическая алопеция. Наиболее распространенной формой выпадения волос является андрогенетическая алопеция (androgenetic alopecia (AGA); OMIM 109200), которая характеризуется сокращенной стадией роста и миниатюризацией ВФ. Андрогенетическая алопеция проявляется как у мужчин, так и у женщин. Клиническая картина проявления андрогенетической алопеции у мужчин отличается от женской: у мужчин облысение начинается с теменной и лобной областей, у женщин волосы редеют в центральной области головы и далее облысение распространяется на ее боковые поверхности. Предрасположенность к андрогенетической алопеции определяется генетически. Активная форма мужского полового гормона тестостерона — дигидротестостерон образуется под действием фермента 5-альфа-редуктазы и регулирует рост ВФ. При андрогенетической алопеции дигидротестостерон — андроген, воздействующий на ДП ВФ, вызывает дистрофию фолликулов. ВФ не достигают максимальной величины и начинают производить тонкий и слабый волос. Природа развития андрогенетической алопеции множественная, при этом факторы появления заболевания разнообразны, наиболее очевидным является избыточное содержание дигидротестостерона; повышенная активность 5-альфа-редуктазы или повышенная чувствительность рецепторов ВФ к дигидротестостерону. Фактором риска развития андрогенетической алопеции могут быть варианты изменения гена рецептора андрогенов (AR) на X хромосоме (Hillmer et al., 2005).

Молекулярная основа полигенных заболеваний волос, таких как андрогенетическая алопеция (AGA; OMIM 109200) и очаговая алопеция (AA; OMIM 104000), остается в значительной степени не определена, хотя распространенность из этих заболеваний волос значительно выше, чем моногенных.

I.13. МУТАНТНЫЕ МЫШИ *we/we wal/wal*

Мутантные мыши двойные гомозиготы *we/we wal/wal* получены в Институте общей генетики РАН путем скрещивания одинарных гомозигот *we/we* и *wal/wal* (Конюхов и др., 2004).

Спонтанная мутация *Wellhaarig (we)* была описана в 1942 году Гертвиг (Hertwig, 1942). У мышей *we/we* формируется курчавый шерстный покров и вибриссы, диаметр волос тоньше по сравнению с нормой. Было показано, что в ВФ мышей *we/we* нарушена кератинизация клеток внутреннего корневого влагалища (Конюхов, 1990).

Спонтанная мутация *Waved alopecia (wal)* была исследована и описана Сорокиной и Бландовой (Sorokina, Blandova, 1985). У мутантных мышей *wal/wal* формируется волнистый шерстный покров, а в возрасте 2-х месяцев наблюдается алопеция, которая представляет собой разреженный волосяной покров, образуются дермальные кисты. Облысение не затрагивает область головы и хвоста (Сорокина, Бландова, 1980; Nakamura et al., 2001).

Было показано, что ген *we* усиливает эффекты гена *wal* и является его модификатором. Облысение у двойных гетерозигот *we/we wal/wal* развивается раньше и усиливается по сравнению с одинарными гомозиготами *wal/wal* (Конюхов Б.В. и др., 2004). Взрослые особи мутантов *we/we wal/wal* почти тотально лысеют после первого цикла регенерации ВФ, деформированные волосы остаются лишь на морде и иногда в виде пятен миниатюрных волос на теле. У мутантов *we/we wal/wal* стадии анагена и телогена первого цикла регенерации ВФ сокращены, а катаген наоборот длится дольше. Во время первого катагена сальные железы сильно увеличены, с началом второго анагена они уменьшаются, но вновь резко увеличиваются к началу второго телогена. (Нестерова и др., 2012).

II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

II.1. МАТЕРИАЛЫ

II.1.1. Лабораторные животные

В работе использовали мышей линии C57BL/6, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» и мутантных мышей *we/we wal/wal*, полученных из вивария Института общей генетики РАН. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры были проведены согласно правилам, установленным комиссией по биоэтике ИБР РАН. При работе с животными руководствовались приказом Минздрава РФ №267 от 19.06.2003 г.

II.1.2. Лабораторное оборудование

Микротом «Microm HM 430», центрифуга «ELMI CM64», криостат «Leica CM 1900», инвертированный микроскоп «Olympus IX51» с флуоресцентной лампой, флуоресцентный микроскоп «Keyence BZ-9000 Bioreveo», световой микроскоп «CKX 31 Olympus», световой микроскоп «Keyence VHX-1000», конфокальный микроскоп «Leica TCS SP5 STED», проточный цитофлуориметр «Beckman Coulter Cell Lab Quanta™ SC MPL».

II.1.3. Химические реактивы

Реактивы: среда DMEM (ПанЭко), среда SnT-07 (CELLnTEC), раствор Хенкса (ПанЭко), DPBS (ПанЭко), гентамицин (ОАО «Дальхимфарм»), диспаза (GIBCO), пенициллин/стрептомицин (ПанЭко), глутамин стабилизированный (Biowest), ЭТС (GIBCO), трипсин (GIBCO), TRITON X-100 (AppliChem), TWEEN 20 (AppliChem), БСА (ХИММЕД), рибонуклеаза А (Sigma), EDTA (Sigma), перекись водорода (Sigma-Aldrich), соляная кислота (Sigma), воск для депиляции (Beauty Image), BrdU (Sigma).

Наборы: набор для определения активности щелочной фосфатазы NBT/BCIP (Roche), набор для иммуногистохимического окрашивания ABC kit (Vector Laboratories), набор для визуализации пероксидазы с помощью DAB (Vector Laboratories).

Фиксаторы: ПФА (Riedel-de Haën), ксилол (Sigma), хлороформ (Sigma-Aldrich), этанол (Константа-Фарм М), формалин (Biovitrum), глутаральдегид (Sigma), осмий (Sigma).

Красители: гематоксилин (Biovitrum), эозин (Biovitrum), DAPI (Vector Laboratories), ТOTO-3 (Molecular Probes), PI (Sigma).

Среды для заключения: среда для оптимальной резки криоблоков (ОСТ, Tissue-Tek), парафиновая среда Гистомикс (Biovitrum), синтетическая монтирующая среда «Био маунт» (Bio Optica), глицерин (Sigma).

Пластиковая посуда: культуральные платы (Corning), пробирки (Corning).

Список использованных антител.

Катало- -жный номер	Наименова- ние антител	Специфичность	Изготовитель	Проду- цент антител	Рабочее разведе- ние
Первичные антитела					
ab 16667	Ki67	Пролиферирующие клетки	abcam	Кролик	1:50
ab 52635	Кератин 5	Базальные кератиноциты	abcam	Кролик	1:250
ab 52816	Кератин 15	Стволовые клетки ВФ	abcam	Кролик	1:100
ab 24643	Кератин 1	Дифференцированные кератиноциты	abcam	Кролик	1:400
sc-15290	EDAR	Зачатки волосяных фолликулов	Santa Cruz biotechnology	Коза	1:100
ab 16051	β -катенин	Зачатки волосяных фолликулов	abcam	Кролик	1:200
#3579	SOX2	Дермальная папилла мыши	Cell signalling	Кролик	1:200
sc-8591	LEF1	Зачатки волосяных фолликулов	Santa Cruz biotechnology	Коза	1:200
	Интегрин β 1	Базальные кератиноциты	В. Белкин	Кролик	1:800
ab 247222	Лорикрин	Кератиноциты гранулярного слоя	abcam	Кролик	1:350
ab 28057	Инволюкрин	Кератиноциты гранулярного слоя	abcam	Кролик	1:800
ab 6326	Anti-BrdU	Клетки, включившие BrdU	abcam	Крыса	1:200
AF 761	Р-кадгерин	Базальные кератиноциты	R&D systems	Коза	1:80
ab 11512	Е-кадгерин	Клетки базального слоя эпидермиса	abcam	Крыса	1:200
ab 14509	Ламинин 5	Базальная мембрана	abcam	Кролик	1:200
ab 2501	Перлекан	Базальная мембрана	abcam	Крыса	1:50
ab 8874	Рецептор р75 NGF	Эмбриональная дермальная папилла мыши	abcam	Кролик	1:350

Вторичные антитела					
A-21206	Alexa 488	Иммуноглобулины кролика	Molecular Probes	Осел	1:800
A-11055	Alexa 488	Иммуноглобулины козы	Molecular Probes	Осел	1:800
A-10040	Alexa 546	Иммуноглобулины кролика	Molecular Probes	Осел	1:800
A-21208	Alexa 488	Иммуноглобулины крысы	Molecular Probes	Осел	1:800

II.2. МЕТОДЫ

II.2.1. Определение типов волос

Стержни волос были удалены из области нижней трети спины вблизи хвоста у мышей в возрасте 17 дней. Стержни разделили по типам согласно наличию изгибов и рядов воздухоносных клеток медуллы, анализируя на световом микроскопе CKX 31 Olympus.

II.2.2. Датирование беременности у мыши

Чтобы добиться датированной беременности, мышей ссаживали вечером в 20 ч (1 самец и 1-3 самки) и на утро проверяли наличие вагинальной пробки. Момент появления пробки датируется как E0 (принято считать, что пробка образуется после совокупления в полночь). При наличии вагинальной пробки первый день эмбрионального развития датировался как E1.5.

II.2.3. Забор материала

Беременных самок умерщвляли цервикальной дислокацией, извлекали эмбрионы, декапитировали и производили забор кожи со спины.

II.2.4. Криоблоки

Эмбриональную кожу заключали в среду для оптимальной резки криоблоков ОСТ (Tissue-Tek) и замораживали сначала в парах азота, далее окуная 2-3 раза по 5-7 сек непосредственно в жидкий азот. Криоблоки хранили при - 70°C. Для иммуногистохимического анализа использовали срезы, толщиной 5 мкм, которые высушивали при комнатной температуре в течение суток, далее фиксировали 4% ПФА (Riedel-de Haën) в течение 10 мин,

промывали 5 раз по 5 мин DPBS (ПанЭко) и проводили иммуногистохимический анализ сразу, либо после 2-3 дней хранения фиксированных, завернутых в фольгу препаратов при - 20°C.

II.2.5. Иммуногистохимическое исследование

Образцы фиксировали 4% ПФА (криосрезы ткани в течение 10 мин, культуру клеток в течение 30 мин при комнатной температуре). Промывали 5 раз по 5 мин DPBS, далее инкубировали с первыми антителами в блокирующем растворе, содержащем PBS, 5% БСА (ХИММЕД) и 0,1% Triton X-100 (AppliChem), в течение 1 ч при +37°C или 12 ч при +4°C во влажной камере. После этого образцы промывали DPBS 5 раз по 5 мин.

Затем образцы инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 1 ч в темноте. Ядра клеток докрашивали DAPI (Vector Laboratories) или Toto-3 (Molecular Probes).

Для визуализации антигена с помощью световой микроскопии применяли другую схему с использованием DAB субстрата пероксидазы (Vector Laboratories). Для этого фиксированные образцы инкубировали с 3%-ным раствором H₂O₂ (Sigma-Aldrich) в течение 5-10 мин, чтобы заблокировать эндогенную активность пероксидазы, затем образец промывали DPBS, далее инкубировали срезы ткани с первыми антителами как описано выше, после промывки DPBS проводили инкубацию со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Vector Laboratories) 30 мин при комнатной температуре. Далее промывали срезы DPBS 5 раз по 5 мин и наносили буферный раствор DAB (Vector Laboratories). После окраски, за появлением которой следили под микроскопом, срезы промывали в проточной воде 10 мин, ополаскивали дистиллированной водой и заключали в глицерин или синтетическую монтирующую среду «Био маунт» (Bio Optica).

В качестве контроля использовали окраску без первых антител.

II.2.6. Выявление активности щелочной фосфатазы

Экспрессию щелочной фосфатазы в клетках ДП и ДК на срезах эмбриональной кожи мыши детектировали с помощью субстрата BCIP. Для этого фиксированные в течение 10 мин в 4% ПФА препараты промывали в DPBS, инкубировали в растворе NBT/BCIP (Roche) в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте и промывали дистиллированной водой.

II.2.7. Гистологическое исследование

Для гистологического исследования образцы ткани фиксировали 10%-ным раствором формалина (Biovitrum). Эмбриональную кожу и постнатальную кожу фиксировали в течение 1сут при комнатной температуре. Далее промывали проточной водой 2 ч, и дегидратировали в спиртах 70° (2 смены), 96° (2 смены), 100° по 40 мин. Биоптат перекладывали в смесь 100° спирта и хлороформа в соотношении 1:1 до погружения, далее выдерживали в хлороформе 15 мин. Затем пропитывали в парафиновой среде Гистомикс (Biovitrum) 3 ч при +37°C и заливали в блок.

После приготовления срезов толщиной 7 мкм на микротоме (Microm HM 430), срезы высушивали 5-24 ч при +37°C. Для окрашивания срезов кожи, срезы депарафинировали в ксилоле и регидратировали, поочередно инкубируя в спиртах понижающейся концентрации. Материал окрашивали гематоксилином (Biovitrum) и спиртовым раствором эозина (Biovitrum), затем споласкивали дистиллированной водой. Обезвоживали препараты через спирты возрастающей концентрации и ксилол, заключали в синтетическую монтирующую среду «Био маунт» (Biovitrum).

II.2.8. Тотальный препарат эмбрионального эпидермиса

Для получения тотальных препаратов кожу с дорсальной стороны эмбрионов мыши промывали раствором Хенкса (ПанЭко), содержащим 80 мкг/мл гентамицина (ОАО «Дальхимфарм»), далее инкубировали в 0,05%-ном растворе диспазы (GIBCO) в среде DMEM (ПанЭко) в течение 12-14 ч при +4°C. После этого отделяли эпидермис, фиксировали в 4% ПФА в течение 30 мин, промывали 5 раз по 5 мин DPBS (ПанЭко). Далее часть препаратов подвергали инкубации в растворе детергентов 0,1% TRITON X-100 (AppliChem), 0,1% TWEEN 20 (AppliChem) в DPBS в течение 30 мин и иммуногистохимическому исследованию, другую часть препаратов заключили в среду для длительного хранения плавающих препаратов,

состоящую из глицерина (Sigma), этиленгликоля и DPBS в соотношении 1:1:2, и хранили при -20°C.

II.2.9. Фиксация тотального эпидермиса для световой микроскопии

Эпидермальный пласт фиксировали 2%-ным раствором глутаральдегида (Sigma) в DPBS в течение 30 мин. Далее промывали 2 раза по 3 мин DPBS и фиксировали 1%-ным OsO₄ (Sigma) в течение 45 мин при комнатной температуре. Вновь промывали 2 раза по 5 мин DPBS, далее обезвоживали в спиртах восходящей концентрации: 30° спирт в течение 1 мин, 50° спирт в течение 10 мин, 70° спирт в течение 20 мин и высушивали на воздухе.

II.2.10. Тотальный препарат постнатального эпидермиса хвоста

Для приготовления тотального препарата эпидермиса, на хвосте делали разрез, снимали кожу с хвоста в виде «чулка». Затем разрезали кожу на кусочки размером 0,5x0,5 см² и инкубировали в растворе 0,2% диспазы в течение 12-18 ч при +4°C или 5 mM EDTA (Sigma) в DPBS в течение 4 ч при +37°C. Далее пинцетом снимали эпидермис и фиксировали 4% ПФА 2 ч при комнатной температуре. Фиксированные пласты эпидермиса промывали 3 раза по 10 мин раствором DPBS, затем проводили иммуногистохимическое окрашивание или хранили в PBS, содержащим 0,2% азида натрия, до 8 нед при +4°C.

II.2.11. Выделение культуры первичных эмбриональных кератиноцитов мыши

Для выделения первичных кератиноцитов кожу с дорсальной и вентральной стороны эмбрионов мыши промывали раствором Хенкса, содержащим 80 мкг/мл гентамицина, далее инкубировали в 0,05%-ном растворе диспазы в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением стабилизированного глутамина (Biowest) 1μM/л в течение 12-14 ч при +4°C. Пинцетом отделяли эпидермис, помещали в раствор 0,25%-ного трипсина (GIBCO) и DPBS в соотношении 1:1, инкубировали при +37°C в течение 7-10 мин. Действие трипсина ингибировали добавлением 5% ЭТС (GIBCO). Далее пипетированием в течение 5-7 сек получали суспензию клеток, которую переносили в другую пробирку. Клетки в суспензии осаждали центрифугированием при 1000 об/мин (200g) 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в среде для культивирования.

II.2.12. Культивирование первичных эмбриональных базальных кератиноцитов мыши

Для культивирования первичных базальных кератиноцитов использовали среду для прогениторных клеток CnT-07 (CELLnTEC) с низким содержанием ионов кальция $0,07\text{мМ Ca}^{2+}$, в которую добавляли раствор пенициллина/стрептомицина (ПанЭко) 50 мкг/мл. Кератиноциты мыши вносили в культуральные флаконы в концентрации 600 тыс клеток/мл (1мл на лунку 24-х луночного плато).

II.2.13. Индукция дифференциации кератиноцитов в культуре

Для индукции дифференцировки после достижения базальными кератиноцитами конфлуентного слоя среду CnT-07 меняли на среду DMEM с нормальным содержанием ионов кальция $1,81\text{ мМ Ca}^{2+}$. Клетки культивировали в течение 24 ч. После этого клетки промывали DPBS, фиксировали 4%-ным ПФА 30 мин при комнатной температуре и проводили иммуноцитохимический анализ.

II.2.14. Проточная цитофлуориметрия

Изучение клеточного цикла в культуре базальных кератиноцитов проводили с помощью окраски PI на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Cell Lab Quanta™ SC MPL. Для этого кератиноциты снимали с пластика добавлением раствора 0,25%-ного трипсина. После того, как клетки открепилась, действие трипсина ингибировали добавлением 5% ЭТС. Далее клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин (200g). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл DPBS. Количество клеток составляло 1,5 млн. Клетки фиксировали 70° спиртом, добавляя по капле 4,5 мл спирта. Клетки в спирте инкубировали в течение 30 мин при + 4°C. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1900 об/мин (750g) и промывали DPBS 2 раза. Для окраски ДНК в осадок добавляли DPBS, содержащий 40 мкг/мл PI (Sigma) и 0,5 мкг/мл рибонуклеазы А (Sigma). Клетки инкубировали в течение 30 мин при +37°C. После инкубации кератиноциты осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1900 об/мин (750g). Осадок ресуспендировали в DPBS. В каждой пробе анализировали не менее 10000 событий.

II.2.15. Выявление метки BrdU в культуре кератиноцитов

Для выявления метки BrdU в культуре кератиноцитов, монослой клеток инкубировали с BrdU (Sigma) в концентрации 10 μ M в течение 2 ч, затем промывали DPBS и фиксировали культуру холодным 70° спиртом в течение 30 мин на холоде. После этого в спирт добавляли равный объем 4N HCl и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем промывали клетки DPBS 3 раза по 10 мин, далее инкубировали в 0,0125%-ном трипсине в течение 5 мин при +37°C. Промывали DPBS и наносили антитела к BrdU (Abcam) в разведении 1:200 в блокирующем растворе, содержащем 5% БСА, 0,3% Triton X-100 в DPBS. Инкубацию проводили в течение ночи при +4°C во влажной камере.

Инкубацию с вторыми антителами проводили по стандартному методу.

II.2.16. Инъекция BrdU новорожденным мышам и выявление метки в тотальном препарате эпидермиса

Мышам в возрасте 6-ти дней проводили подкожную инъекцию 50 мг/кг BrdU (одна инъекция содержит 20 мкл раствора на животное, концентрация BrdU 12,5 мг/мл). Всего проводили 4 инъекции через каждые 12 ч (Braun et al., 2003). Для выявления метки BrdU в ВФ тотальных пластов эпидермиса хвоста взрослых животных (C57Bl/6 на P57; *we/we wal/wal* на P54) использовали протокол, описанный в пункте II.2.15, с небольшими изменениями: в растворе трипсина инкубировали 9-10 мин и в растворе первых антител инкубацию проводили в течение 2-х суток при + 4°C в пробирках типа Эппендорф.

II.2.17. Модель заживления кожной раны

Мышей в возрасте 8 месяцев наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата концентрацией 300 мг/кг веса животного, вводили 200 мкл. Между лопаток ножницами вырезали кусочек кожи размером 10x10 мм. Динамику закрытия раны определяли, измеряя ширину раны на 3,6,7,9 и 13 сут. На 13 сут животных умервщляли передозировкой наркоза, вырезали участок раны с захватом здоровой окружающей ткани, с последующей фиксацией и заключением для гистологического исследования. В эксперименте использовали по 4 животных в опыте и контроле.

II.2.18. Индукция стадии роста волосяных фолликулов с помощью депиляции

Депиляцию у мышей C57Bl/6 проводили на P23 на стадии телогена первой генерации ВФ. Мутантных мышей *we/we wal/wal* депилировали на P20, так как было показано, что телоген у мутантов короче, чем у C57Bl6 (Nesterova et al 2012).

Для депилирования мышей (по 4 животных в опыте и контроле) наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата концентрацией 300 мг/кг веса животного, в животное вводили 200 мкл. На верхние 2/3 спины наносили предварительно разогретый воск для депиляции Beauty Image (Испания). После того, как воск остыл, резким движением депилировали область шерстного покрова. Спустя 10 сут на стадии анагена (Muller-Rover S, 2001) кусочек депилированной кожи забирали, фиксировали 10%-ным раствором формалина (Biovitrum) и заключали в парафиновые блоки для гистологического исследования или замораживали для иммуногистохимического исследования.

II.2.19. Статистическая обработка результатов

Подсчет в культуре клеток, позитивных по исследуемому маркеру. Ki67+, BrdU+ и инволюкрин+ клетки в культуре опытной и контрольной группы животных подсчитывали по фотографиям 15 полей зрения, сделанных с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 при увеличении объектива 20х и окуляра 10х. Число положительно окрашенных по исследуемому маркеру клеток выражали в процентах по отношению к общему числу клеток. Исследование проводили в трех повторах.

Подсчет ВФ. На каждом 5-ом гистологическом срезе кожи E18.5 от пяти эмбрионов в каждой группе было подсчитано количество ВФ в поле зрения. Было проанализировано 55 полей зрения срезов эмбриональной кожи *we/we wal/wal* и 48 полей зрения в контроле. Вычислили и сравнили среднее число ВФ на поле зрения.

На тотальном препарате число ВФ в опытной и контрольной группе животных считали на 12-ти фотографиях, сделанных с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 при увеличении x100. Среднее значение дистанции между ВФ рассчитывали из 33-х измерений. Ширину и высоту измерили у 25-ти ВФ. Количество образцов на каждую группу составляло 3. Дистанцию, ширину и высоту измеряли с помощью программного обеспечения светового микроскопа Keyence VHX-1000.

Для совмещения цветных фотографий и подсчета положительных по исследуемому маркеру структур использовали аналитическую программу ImageJ. Построение графиков проводили в программе Excel (Microsoft). Статистическую обработку полученных данных

проводили, используя t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни. Различие считали статистически значимым при $p < 0,05$. Анализируемые значения в гистограммах приведены в виде среднего арифметического значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM).

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

III.1. ФЕНОТИП ШЕРСТНОГО ПОКРОВА ПОСТНАТАЛЬНЫХ МЫШЕЙ *we/we wal/wal*

III.1.1. Общая характеристика шерстного покрова

Взрослые особи мутантов *we/we wal/wal* почти тотально лысеют после первого цикла регенерации ВФ (P27). Деформированные пигментированные волосы остаются лишь на морде и на теле в виде редких пятен. Также на спине у мышей при тщательном осмотре выявляются депигментированные миниатюризированные волосы, напоминающие волосы веллус у людей. Вибриссы всегда деформированы, но в разной степени: либо стержней вибрисс не видно, либо они короткие и сильно извитые (рис. 24).

Мы проанализировали фенотип шерстного покрова на протяжении первого цикла регенерации волос. Шерстный покров в первые дни после рождения (P10), когда ВФ пребывают на стадии роста, напоминает замшу (рис. 25а'). Остевых – самых длинных стержней волос – не наблюдается. На стадии первого катагена (P17) облысение начинается с затылочной части головы и распространяется на весь шерстный покров спины (рис. 25б'). К концу первого телогена (P27) мыши *we/we wal/wal* окончательно утрачивают нормальный шерстный покров и остаются практически лысыми с редкими, депигментированными миниатюризированными волосами на спине (рис. 25в').



Рис.24. Взрослые особи *we/we wal/wal* в возрасте 16 недель

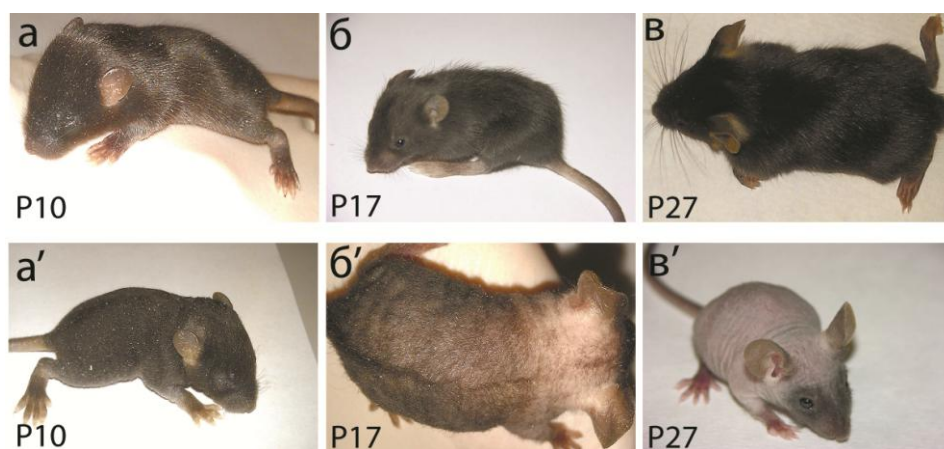


Рис.25. Фенотип шерстного покрова спины в ходе первого цикла регенерации ВФ. а), б), в) C57Bl/6; а'), б'), в') *we/we wal/wal*

Наши наблюдения согласуются с опубликованными ранее данными, согласно которым первые признаки алопеции у мутантов появляются на P16. К P21 алопеция усиливается и к P28 мыши становятся почти лысыми (Конюхов и др., 2004; Нестерова, 2010). Также известно, что

ВФ мутантов проходят первые два цикла регенерации, но продолжительность стадий цикла сильно отличается от контроля. Было показано, что у мутантов стадии анагена и телогена волос первой и второй генерации сокращены, а катаген наоборот длится дольше (Нестерова, 2010; Нестерова и др., 2012). Характер облысения мутантов *we/we wal/wal* отчасти напоминает циклическую алопецию у мышей, нокаутированных по *Msx2* и *Sox21* (Ma et al., 2003; Kiso et al., 2009).

Msx2 в норме экспрессируется в матриксе и кортексе волоса на всем протяжении цикла ВФ. Мыши *Msx2*^{-/-} рождаются с вьющимися волосами, при этом диаметр стержня волоса по всей длине не регулярен. Облысение начинается на P14. Было показано, что у мышей *Msx2*^{-/-} укорочена стадия анагена, а стадия катагена начинается преждевременно и длится дольше, чем в норме. Известно, что мыши со спонтанной мутацией *angora* (*Fgf5*^{-/-}) имеют удлиненную стадию анагена (Hebert et al., 1994; Sundberg et al., 1997). Чтобы проверить взаимодействие между генами *Msx2* и *Fgf5* и влияние мутации *Fgf5* на продолжительность стадии анагена у мышей *Msx2*^{-/-}, были получены мутантные мыши, несущие обе мутации. Двойные мутанты *Msx2*^{tm1Rilm} *Fgf5*^{go} имели и длительный анаген, характерный для мутации *Fgf5*, и длительный катаген – для *Msx2* (Ma et al., 2003). В Институте общей генетики РАН были получены тройные мутантные гомозиготы *Fgf5*^{goY}/*Fgf5*^{goY} *we/we wal/wal*. У этих мутантов также наблюдали удлинение стадии анагена и позднее выпадение волос по сравнению с двойными гомозиготами *we/we wal/wal* (Нестерова, 2010; Нестерова и др., 2012).

SOX21 экспрессируется в кутикуле и прогениторных клетках стержня волоса мыши и человека. Мыши *Sox21*^{-/-} рождаются с короткими волосами, циклическая алопеция после P15 прогрессирует в каудальном направлении. При отсутствии *Sox21* экспрессия генов, кодирующих кератины и связанные с кератинами белки в кутикуле волоса, понижается, нарушается крепление стержня волоса. *Sox21* является регулятором дифференциации кутикулы волоса (Kiso et al., 2009).

Наблюдаемая потеря волос у мышей *we/we wal/wal*, распространяющаяся в каудальном направлении соотносится с преждевременным началом и большей продолжительностью стадии катагена (Нестерова и др., 2012). Однако, если бы дефект был связан только с нарушением длительности стадий регенерации ВФ, то мыши на протяжении всей жизни имели бы короткие стержни волос соответственно короткой стадии анагена. Но так как у мутантов *we/we wal/wal* развивается практически тотальная алопеция, следовательно, существуют и другие причины: хрупкие стержни волос и/или нарушение процесса формирования полноценного ВФ и производимого им стержня волоса. Например, известно, что мутация гена *Ctsl* приводит к нарушению синтеза трихогиалина, заякориванию стержня волоса, усиленной пролиферации и задержке терминальной дифференциации кератиноцитов луковицы ВФ, нарушению

терминальной дифференциации кератиноцитов при формировании канала волоса, что ведет к дефектам прорастания стержня волоса наружу. У мутантных мышей *Ctstl^{hkt}/Ctstl^{hkt}* развивается облысение (Roth et al., 2000; Benavides et al., 2002; Tobin et al., 2002; Potts et al., 2004). Мутация гена *Dsg3* (структурного белка десмосом) вызывает нарушение заякоривания стержня волоса в ВФ на стадии телогена. Мутантные мыши *Dsg3^{bal}/Dsg3^{bal}* и мыши *Dsg3*^{-/-} имеют одинаковый фенотип, в обеих линиях мышей развивается облысение (Koch et al., 1997; Koch et al., 1998; Pulkkinen et al., 2002).

III.1.2. Структура стержней волос

У мыши в норме в шерстном покрове спины присутствует 4 типа волос: остевые, шиловидные, пуховые и зиг-заг (рис. 26а). Мы проанализировали состав шерстного покрова у мутантов *we/we wal/wal* в сравнении с C57Bl/6. Волосы разделили на типы по числу рядов воздухоносных клеток медуллы и изгибов стержня волоса (Schlake, 2007; Duverger, Morasso, 2009). Стержни остевых волос самые длинные, прямые и имеют 2 ряда воздухоносных клеток медуллы. Стержни шиловидных волос приблизительно в 2 или 3 раза короче остевых, прямые и имеют 2 ряда воздухоносных клеток медуллы. Стержни пуховых волос имеют такую же длину и медуллы как шиловидные, но имеют один изгиб. Стержни волос типа зиг-заг такой же длины как шиловидные и пуховые, имеют 1 ряд воздухоносных клеток медуллы и 3-4 изгиба.

У мышей *we/we wal/wal* мы идентифицировали все 4 типа волос (рис. 26а'). Однако имелись также нехарактерные для нормы короткие стержни остевых волос. У мутантов соотношение волос в пределах типов отличалось от нормы тем, что пуховых волос было в несколько раз больше (12,3%) по сравнению с контролем (1,7%) (рис. 26б). Шиловидные волосы отличаются от пуховых тем, что имеют прямой стержень без изгиба. У мутантов в стержнях шиловидных, пуховых и зиг-заг волос обнаружены области агрегации пигмента и нарушение его распределения (рис. 26а'). Стержни настолько деформированы, что могут образовывать несколько изгибов, перекруты и «гармошки». Это сильно затрудняет определение типа. Возможно, сильно деформированные шиловидные волосы были приняты за пуховые. Особо сильным деформациям у мутанта подвержены стержни волос типа зиг-заг (рис. 26а').

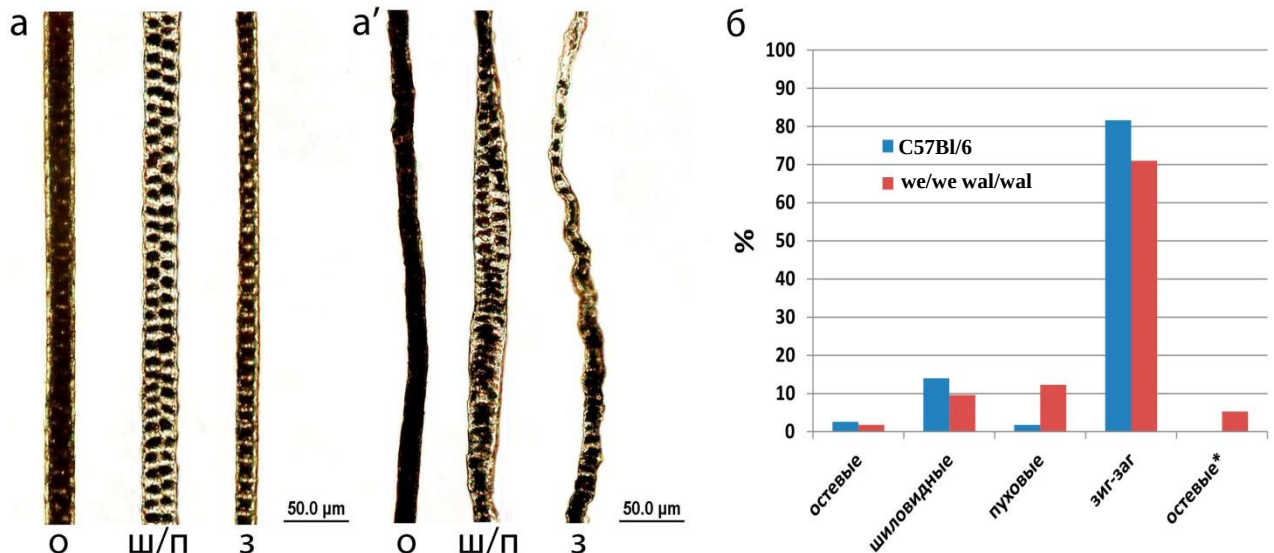


Рис.26. Типы волос шерстного покрова спины. а) C57Bl/6; а') *we/we wal/wal*; б) количественное соотношение стержней волос в пределах типа. Световая микоскопия.

О – остевые, Ш – шиловидные, П – пуховые, З – зиг-заг, * – короткие остевые.

Известно, что у мутантных гомозигот *we/we* нарушен процесс кератинизации клеток внутреннего корневого влагалища. Было показано, что слой наружного корневого влагалища мышей *we/we* тоньше, чем у нормальных мышей, и выдвинуто предположение, что это может быть следствием гипертрофии клеток внутреннего корневого влагалища (Конюхов, Куприянов, 1990). Наблюдаемая деформация стержней волос у мутантных мышей *we/we wal/wal*, вероятно, является проявлением мутантного гена *we*. Усиление дезориентации пигмента стержней волос у двойных гомозигот *we/we wal/wal* происходит при взаимодействии двух мутаций *we* и *wal*.

Таким образом, процесс генерации стержней волос *we/we wal/wal* сильно нарушен и алопеция сопровождается серьезными деформациями структуры стержня волоса.

III.2. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ МЫШЕЙ *WE/WE WAL/WAL*

III.2.1. Выявление стволовых клеток волосяных фолликулов, длительно сохраняющих метку ДНК

Известно, что СК ВФ – резидентные, медленно циклирующие СК, длительно сохраняющие метку ДНК (Cotsarelis et al., 1990; Terskikh et al., 2012).

Чтобы идентифицировать СК ВФ, мы использовали метод мечения BrdU. Новорожденным мышам *we/we wal/wal* и C57Bl/6 в возрасте 6 дней инъецировали подкожно BrdU (4 инъекции с интервалом 12 часов). Спустя 57 дней у мышей C57Bl/6 и 54 дня у мутантов *we/we wal/wal* забирали эпидермис хвоста в период позднего телогена второго цикла/раннего анагена третьего цикла. У *we/we wal/wal* эпидермис с ВФ забирали на 3 дня раньше, чем у C57Bl/6, так как было известно, что телоген у мутантов короче, чем в норме (Нестерова и др., 2012). Для исследования использовали эпидермис хвоста, так как известно его преимущество в плотности по сравнению с эпидермисом спины (Braun et al., 2003; Braun, Watt, 2004).

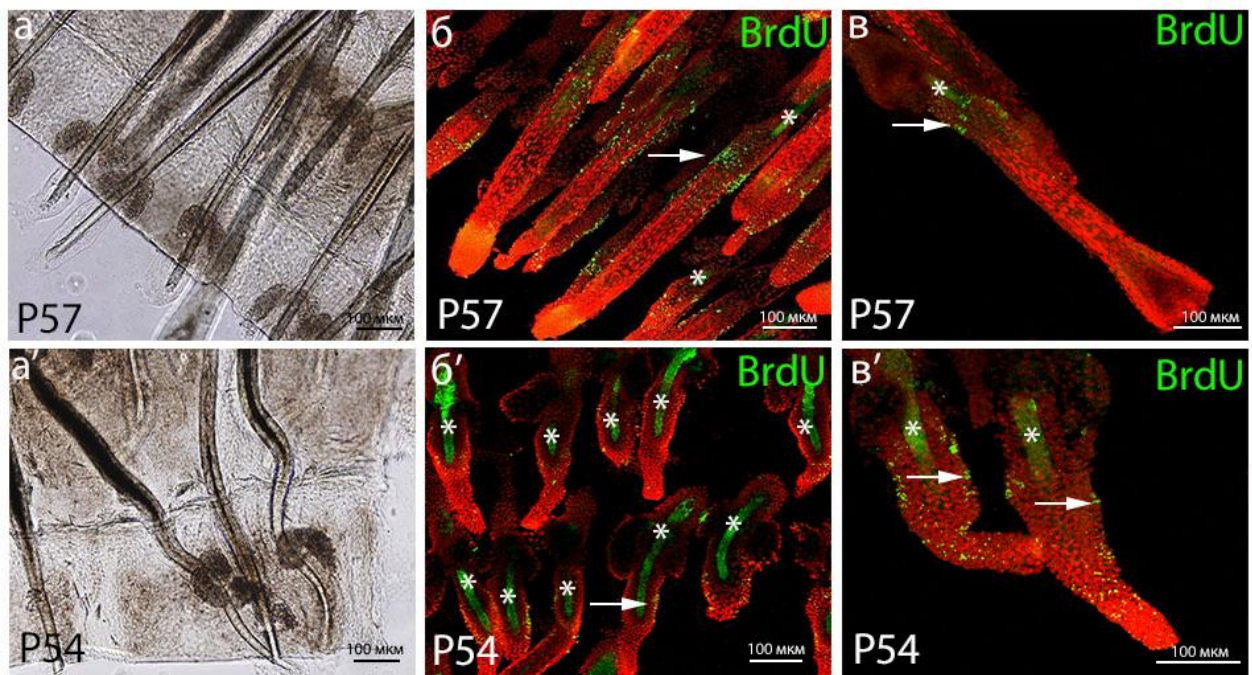


Рис.27. Стволовые клетки ВФ, длительно сохраняющие метку BrdU. а, б, в) C57Bl/6; а', б', в') *we/we wal/wal*; а, а') световая микроскопия, фазовый контраст; б, б', в, в') конфокальная микроскопия, иммуногистохимия, ядра клеток докрашены ТОТО-3 (красный). Стрелка указывает на BrdU⁺ клетки (зеленый); * – аутофлуоресценция стержня волоса.

В норме в ВФ на стадии анагена зона БЖ имеет ограниченную область, расположенную четко под сальной железой в месте прикрепления мышцы, поднимающей волос. В ВФ на стадии телогена клетки БЖ распределены по всему ВФ под сальной железой, так как после стадии катагена луковица ВФ подвергается инволюции и сохраняется практически только

область БЖ и вышележащая сальная железа (Braun et al., 2003; Fuchs et al., 2004; Hammond et al., 2012).

У мышей C57Bl/6 подавляющее большинство ВФ на P57 находятся на ранней стадии анагена, судя по оформленной луковице и размеру ВФ (рис. 27а-в). У мышей C57Bl/6 соответственно стадии роста, BrdU+ клетки БЖ ВФ четко выделяются под сальными железами (рис. 27б, в). В отличие от контрольных ВФ, стадию циклирования мутантных фолликулов было трудно определить, так как ВФ были сильно извитыми (рис. 27а', б', в'). Однако, большинство мутантных ВФ на P54, по всей видимости, находятся на стадии телогена, поскольку их луковицы имеют продолговатую форму и значительно меньше по размеру, чем в норме (рис. 27б', в'). Соответственно стадии телогена, у мутантных ВФ границы области БЖ четко не определяются. BrdU+ клетки распределяются хаотично по всему фолликулу, но преимущественно в верхней его части (рис. 27б', в'). Таким образом, популяция СК ВФ, длительно сохраняющих метку ДНК, у мутантов сохраняется.

III.2.2. Экспрессия кератина 15, маркера стволовых клеток волосяных фолликулов

Помимо длительного сохранения метки, СК ВФ характеризуются экспрессией типичных для них молекулярных маркеров. Одним из белков-маркеров СК ВФ является кератин 15 (K15) (Morris et al., 2004). При иммуногистохимической окраске антителами против K15 (рис. 28), экспрессию K15 выявили в области БЖ под сальными железами у ВФ на стадии анагена и по всему ВФ на стадии телогена, как в ВФ C57Bl/6 (рис. 28а), так и в ВФ *we/we wal/wal* (рис. 28а'). Паттерн экспрессии K15 совпадал с областью распределения BrdU + клеток.

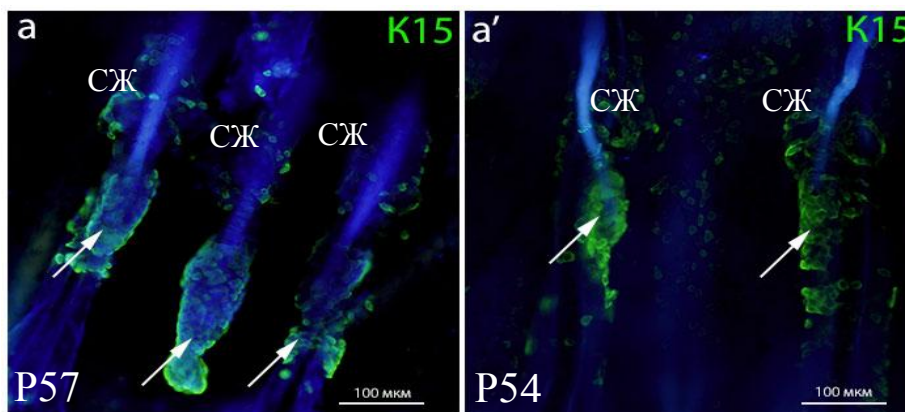


Рис.28. Экспрессия маркера СК K15 в зрелых ВФ. а) C57Bl/6; а') *we/we wal/wal*. Флуоресцентная микроскопия. Иммуногистохимия, ядра клеток докрашены DAPI (синий); стрелка указывает на K15+ клетки (зеленый), СЖ – сальная железа.

Наши результаты показывают, что фолликулярные СК в мутантных ВФ сохраняются. По всей видимости, развивающаяся алопеция у мышей *we/we wal/wal* не связана с истощением пула СК. Характер облысения мутантов имеет некоторые аналогии с облысением человека.

Известно, что у людей с андрогенетической алопецией ВФ уменьшаются в размере. В работе Garza и соавторов (Garza et al., 2011) была сделана попытка ответить на вопрос: связано ли уменьшение размеров ВФ с потерей пула СК или прогениторных клеток. Исследователи, проанализировав интактные и облысевшие участки скальпа больных андрогенетической алопецией, обнаружили наличие и СК, и прогениторных клеток. Далее клетки, экспрессирующие K15, CD200, CD34 и интегрин $\alpha 6$, подвергли количественной оценке с помощью проточной цитофлуориметрии. Покоящиеся, малого размера СК экспрессировали K15 на высоком уровне. Данная популяция клеток сохранялась в облысевших участках кожи. Популяция клеток, высоко экспрессирующих одновременно CD200 и интегрин $\alpha 6$ и популяция высоко экспрессирующих CD34 клеток, составляли пул прогениторных клеток, располагавшихся вблизи БЖ и обладавших большим пролиферативным потенциалом, чем высоко экспрессирующие K15 СК. Популяция прогениторных клеток была значительно малочисленнее в облысевших участках кожи больных. Интересно, что аналогичная популяция клеток, высоко экспрессирующих одновременно CD200 и интегрин $\alpha 6$ в ВФ мыши, является мультипотентной и регенерирует новые ВФ в экспериментах по реконструкции кожи, когда пересаженные бестимусным мышам эти клетки вместе с неонатальными дермальными клетками формируют ВФ. Результаты этой работы поддерживают мнение, что в основе патогенеза андрогенетической алопеции лежит нарушение перехода СК в прогениторные клетки (Garza et al., 2011). Вполне возможно, что данный переход может быть нарушен и в ВФ мутантных мышей *we/we wal/wal*, учитывая миниатюризацию волос мышей с возрастом.

Алопеции по характеру разрушения ВФ подразделяют на рубцовые и нерубцовые. Локализация СК ВФ в области БЖ может объяснить, почему некоторые виды алопеций, ведущих к воспалительным реакциям вызывают устойчивую потерю волос, а другие обратимы (Paus, Cotsarelis, 1999). При рубцовых алопециях воспалению подвергается поверхность ВФ, в том числе и зона БЖ. Предполагается, что повреждаются СК, необходимые для восстановления ВФ (Mobini et al., 2005). Однако, при очаговой алопеции, воспалительному повреждению особенно на ранних стадиях подвержены луковицы ВФ, содержащие клетки-потомки БЖ (Whiting, 2003). Поскольку луковица ВФ отвечает за производство стержня волоса, ее разрушение приводит к потере волос. Но, так как область БЖ остается незатронутой, то при последующем анагене может быть произведен новый стержень волоса. Любопытно, что даже у пациентов с очаговой алопецией, наблюдаемой в течение многих лет, либо спонтанно, либо в ответ на иммуномодуляцию могут вырасти волосы. Учитывая наличие K15+ области БЖ и длительно-сохраняющих метку ДНК СК у мутантных ВФ, облысение мышей *we/we wal/wal* можно отнести к циклической, не воспалительной алопеции нерубцового типа.

III.3. РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЖИ И ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ МЫШЕЙ *we/we wal/wal*

III.3.1. Индукция роста волосяных фолликулов

Известно, что удаление стержня стимулирует ВФ вступать в стадию анагена и продуцировать новый стержень (Muller-Rover et al., 2001). Чтобы оценить способность мутантных ВФ формировать новый стержень волоса второй генерации мы удалили стержни волос на коже спины мышей *we/we wal/wal* и C57Bl/6 с помощью депиляции.

Депиляцию волос на спине у мышей C57Bl/6 проводили на P23 (ранний телоген первого цикла) (рис. 6а). Мутантных мышей *we/we wal/wal* депилировали на P20 (рис. 29а'), так как было показано, что телоген у мутантов короче, чем у C57Bl/6 (Нестерова и др., 2012). Спустя 10 дней после депиляции (анаген IV), депилированные участки спины контрольных животных были покрыты короткой шерстью (рис. 29б). У мутантов вся кожа спины и место депиляции были равномерно пигментированы (серая кожа), стержней волос на поверхности кожи не было видно (рис. 29б'). Гистологический анализ депилированного участка кожи спустя 10 дней в контроле показал полноценно развитые, активно растущие ВФ с длинными стержнями волос (рис. 29в). На срезе кожи в контроле также определяются активно растущие ВФ со стержнями волос, которые выходят на поверхность кожи (рис. 29г). Наличие ДП внутри луковиц ВФ указывает на то, что ВФ действительно находятся на стадии анагена (рис. 29г). Кроме того, в ДП контрольных ВФ определяется активность щелочной фосфатазы (рис. 29д). Экспрессия Ki67 (рис. 29е) и LEF1 (рис. 29ж) указывает на активную пролиферацию клеток луковиц ВФ и реализацию сигнального пути WNT, необходимого для роста ВФ. Е-кадгерин синтезируется в матриксе волоса и наружном корневом влагалище активно растущих ВФ (рис. 29з). Плотность фолликулов в депилированном участке кожи мутантов намного ниже, чем в норме, производимые ими стержни волос дистрофичные и короткие (рис. 29в'). На срезе кожи мутантов также определяются активно растущие ВФ с заключенной внутри луковиц ДП (рис. 29г'). Кроме того, в ДП и соединительно-тканном чехлике мутантных ВФ также определяется активность щелочной фосфатазы (рис. 29д'). Характер экспрессии белков Ki67 (рис. 29е'), LEF1 (рис. 29ж') и Е-кадгерина (рис. 29з') в мутантных ВФ практически не отличается от контроля. Однако, как при осмотре кожи мутантных мышей (рис. 29б'), так и на гистологических срезах (рис. 29г') видно, что стержни волос не выходят на поверхность кожи. По всей видимости, после депиляции у мутантных ВФ активация роста волоса проходит успешно и это подтверждается наличием анагеновых луковиц ВФ (рис. 29г', д', е', ж', з'). Но дифференциация и формирование стержня волоса крайне нарушены. Мутантные ВФ не способны формировать полноценный стержень волоса должной длины.

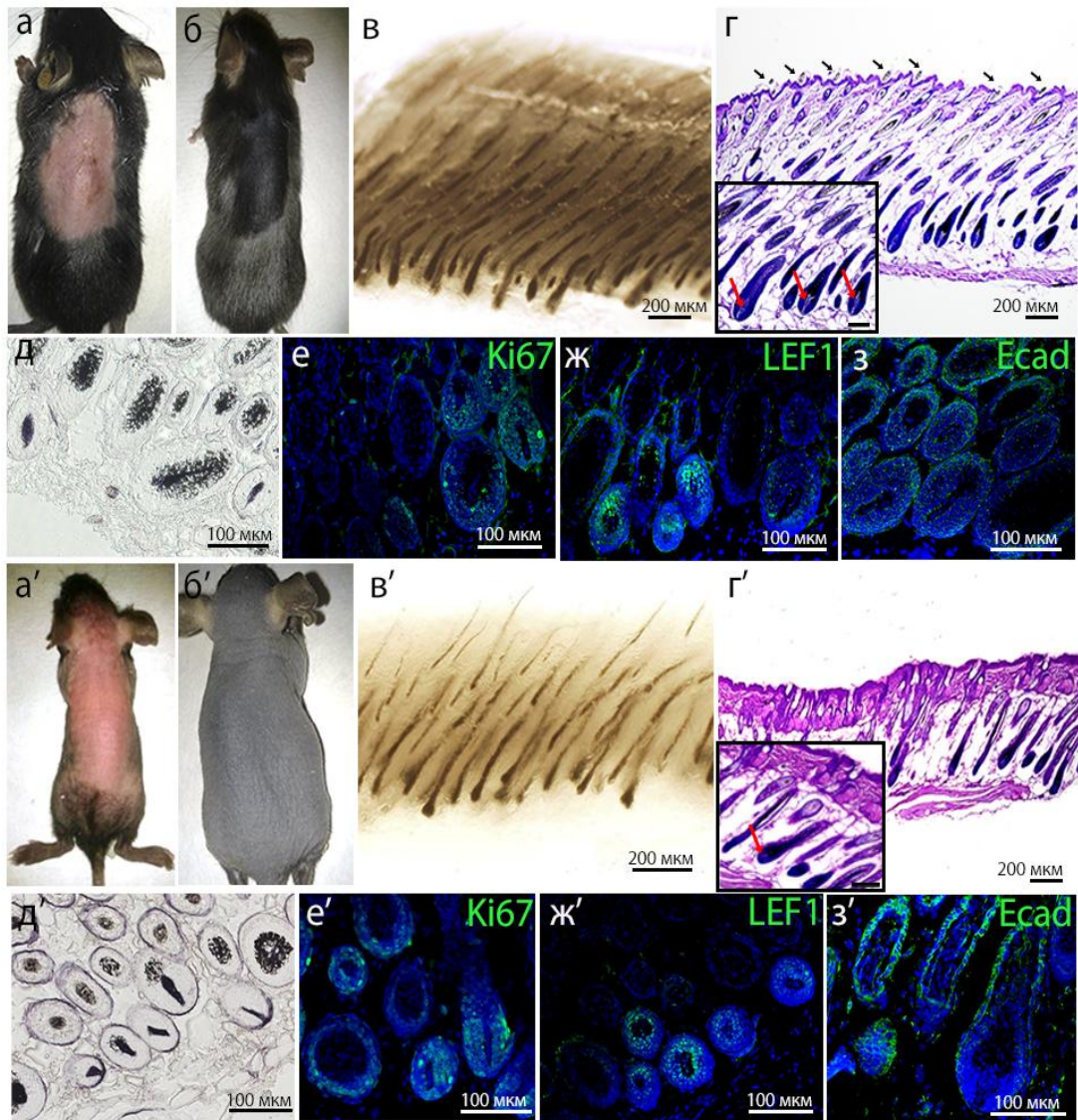


Рис.29. Кожа спины мышей после депиляции воском.

а-з) C57Bl/6; а'-з') *we/we wal/wal*; а, а') кожа непосредственно после депиляции волос; б, б') кожа спустя 10 дней после депиляции волос; в, в') парафиновый блок участка кожи спустя 10 дней после депиляции в проходящем свете; г, г') срез кожи спустя 10 дней после депиляции. Световая микроскопия. Окраска гематоксилином и эозином; д, д') экспрессия щелочной фосфатазы (фиолетовый); е, е') окраска антителами против Ki67 (зеленый); ж, ж') окраска антителами против LEF1 (зеленый); з, з') окраска антителами против Е-кадгерина (зеленый).

Черные стрелки указывают на стержни волос на поверхности кожи; красные стрелки – ДП внутри луковиц ВФ; е,е', ж,ж', з,з') ядра клеток докрашены DAPI (синий).

Ранее было описано, что ВФ мутантов проходят 2 цикла регенерации. Продолжительность их стадий циклирования значительно отличается от нормы (Нестерова и др., 2012). Однако, не было подробного изучения морфологических особенностей структуры ВФ второй генерации по сравнению с контролем. Депиляция позволяет проследить синхронное вступление ВФ в стадию роста одновременно у мутантных и контрольных животных. Так как на продолжительность стадий цикла регенерации ВФ мыши могут оказывать влияние не только

мутации, но и пол животных, возраст, питание и температура, то преимущество депиляции состоит в том, что она позволяет нивелировать эти отклонения и стандартизировать единовременное начало стадии роста. В литературе для характеристики мутаций, оказывающих влияние на фенотип волос мышей, методику депиляции используют для описания реакции ВФ на активацию стадии роста и формирование нового шерстного покрова (Ma et al., 2003; Kiso et al., 2009).

Результаты депиляции подтверждают прогрессивный рост ВФ у мутантов, наличие и активность СК ВФ. Однако потенциала СК ВФ не достаточно для формирования длинного и полноценного стержня волоса. Вероятно, у мутантных ВФ нарушен процесс дифференциации СК ВФ. Это может коррелировать с сокращенным анагеном (Нестерова и др., 2012), деформацией стержней волос и нарушением ориентации пигмента у взрослых особей *we/we wal/wal*.

Основной массив работ в области регуляции СК посвящен роли сигнальных путей WNT, FGF, BMP и некоторых других (Chen, Chuong, 2012; Hsu, Fuchs, 2012; Kandyba et al., 2013). Однако это слабо прояснило вопрос о контроле активации СК, перехода СК в транзиторно-амплифицирующий компартмент и дифференцировку клеток в структуры ВФ. Учитывая последние достижения в исследовании ремоделирования хроматина, некодирующих РНК, эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов (Ezhkova et al., 2011; Wapinski and Chang, 2011; Botchkarev et al., 2012) описание точной картины перехода СК ВФ в специализированные клетки ВФ усложняется. В некоторых недавних работах описано, что делеция транскрипционных коактиваторов в кератиноцитах приводит к развитию прогрессирующей алопеции разными путями (Beverdam et al., 2013; Nakajima et al., 2013). В одном случае СК ВФ легко активируются, но быстро истощаются (Nakajima et al., 2013). В другом случае был обнаружен избыток СК ВФ, которые не были способны дифференцироваться (Beverdam et al., 2013).

Облысение может быть вызвано несколькими различными механизмами: ухудшением формирования ВФ, нарушением регенерации или разрушением ВФ. Снижение регенерации ВФ происходит по нескольким причинам: вследствие истощения пула СК, нарушений процессов активации или дифференциации СК. У мышей *we/we wal/wal* пул СК ВФ сохраняется, но механизм перехода в транзиторный компартмент нарушен.

III.3.2. Заживление кожной раны у взрослых особей *we/we wal/wal*

Ранозаживление кожи – сложный комплексный процесс, результат взаимодействия подкожно-жировой клетчатки, дермы и эпидермиса, который проходит следующие фазы: воспаление, пролиферация и эпителизация. Закрытие раневой поверхности включает в себя механизмы клеточной адгезии, активного синтеза ВКМ, пролиферации, дифференциации клеток и неогенеза ткани в целом.

Известно, что в процессе заживления кожной раны участвуют и СК эпидермиса и ВФ (Ito et al., 2005; Plikus et al., 2012). Чтобы оценить функциональность зрелой кожи и эпидермальных СК, мы проанализировали характер и темпы закрытия раны у мутантов *we/we wal/wal* в сравнении с контролем.

В начале эксперимента, анализируя темпы закрытия раны (рис. 30), мы предположили, что рана у мутантов закрывается медленнее (имеет тенденцию к этому) (рис. 30д). Это объясняется тем, что внешне контракция раны у некоторых особей мутантных мышей была выражена слабее, чем в норме, и размер струпа уменьшался медленнее (рис. 30б). Однако, при анализе гистологических препаратов обнаружили, что эпителизация раневой поверхности у мутантов проходит успешно (рис. 30г, г', д, д'). Анализ динамики закрытия раны (рис. 30е) и срезов кожи на 13 сут ранозаживления (рис. 30д, д') показал, что характер и темпы заживления кожной раны у мутантных мышей не отличались от контроля. Кожа мутантов сохраняет потенциал к регенерации, сопоставимый с нормой. Это не вызывает удивления, учитывая сохраненный компартмент СК ВФ.

Известно, что после ранения СК ВФ мигрируют в область раны и способствуют эпителизации раневой поверхности (Ito et al., 2005; Levy et al., 2007). В области БЖ находятся разные популяции СК. Так, например, известно, что GLI1+ клетки БЖ ВФ временно заселяют рану в первые дни заживления и участвуют в неоваскуляризации дермы (Brownell et al., 2011). LGR6+ клетки расположены чуть выше области БЖ и охарактеризованы как эпидермальные СК. Эти клетки в норме во внутриутробном периоде первоначально обнаруживаются в плакодах ВФ, далее образуют ВФ, сальные железы и межфолликулярный эпидермис. В постнатальном периоде они генерируют сальные железы и интерфолликулярный эпидермис, в то время как их вклад в ВФ постепенно уменьшается с возрастом. LGR6+ клетки обеспечивают долгосрочное заживление раны, в том числе формирование новых ВФ на месте ранения (Snippert et al., 2010). Однако, источник формирования новых ВФ до конца не определен, поскольку по некоторым данным ВФ на месте ранения образуются *de novo* из СК эпидермиса, реализуя сигнальный путь WNT. Авторы данного исследования предполагают, что ранение

провоцирует кожу приобретать эмбриональный фенотип, при этом эпидермальные клетки приобретают фенотип фолликулярных СК (Ito et al., 2007).

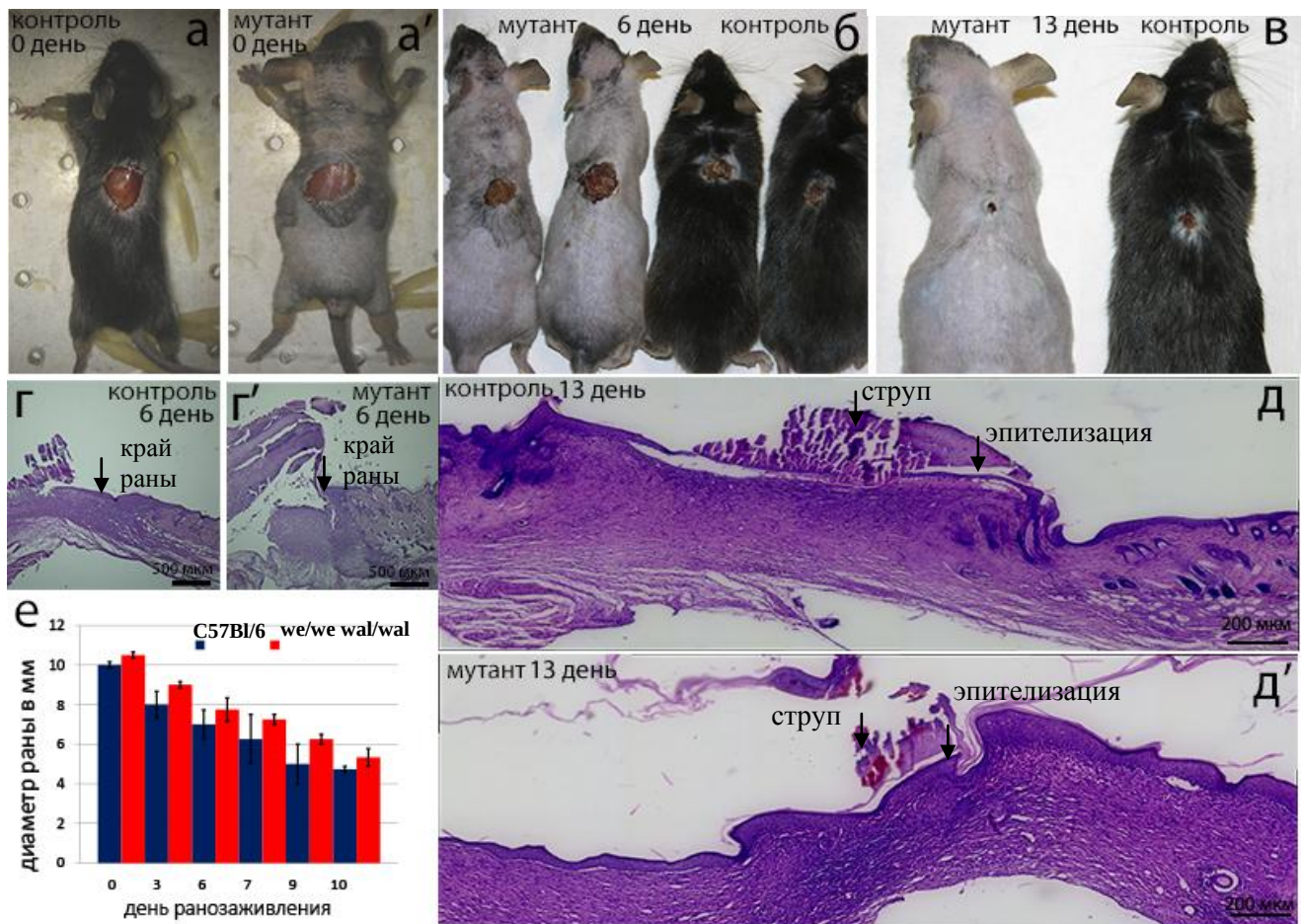


Рис.30. Динамика заживления кожной раны зрелых мышей.

а, а') 0 день, нанесение раны; а) C57Bl/6; а') *we/we wal/wal*; б) 6 день заживления; в) 13 день заживления; г, г') срез кожи в области раны на 6 день заживления, окраска гематоксилином и эозином, величина шкалы – 500 мкм; д, д') срез кожи в области раны на 13 день заживления, окраска гематоксилином и эозином, шкала 200 мкм; г, д) C57Bl/6; г', д') *we/we wal/wal*; е) размер раны в мм.

Заживление раны – это многофакторный процесс, который в коже нацелен на восстановление барьера. В этом процессе участвует нескольких клеточных типов, включая кератиноциты, фибробласты, адипоциты, эндотелиальные клетки, макрофаги и синтезируемый клетками ВКМ. Миграция, пролиферация и дифференциация этих клеток завершает воспалительную реакцию и впоследствии формируется новая ткань. Процесс закрытия раны осуществляется и регулируется равным образом комплексной сигнальной системой, включающей многочисленные факторы роста, цитокины и хемокины. Эти факторы являются решающими для координации множества типов клеток во время процесса заживления. В острой ране, процесс заживления управляется пластичностью СК кожи и пространственно-временным действием факторов роста, цитокинов и хемокинов. От наличия и активности этих компонентов

во многом зависит прогрессия заживления и, в результате, восстановление функции кожного барьера (Barrientos et al., 2008; Wong et al., 2013). Гистологически процесс заживления раны у мутантов практически не отличается от контроля. Все вышеуказанные фазы сохранены и осуществляются в пределах нормы.

У мутантов мы идентифицировали СК ВФ, которые, как видно, обеспечивают регенерацию ВФ и гомеостаз кожи. Динамика заживления кожных ран у мутантов соответствует нормальным темпам закрытия раневой поверхности. Регенерация проходит без грубых нарушений, за исключением того, что в некоторых случаях было выявлено замедление контракции. Облысение мышей *we/we* *wal/wal* не оказывает значительного влияния на процессы заживления кожи при обширном ранении.

III.4. ПАТТЕРН РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ПАРАМЕТРЫ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ ЭПИДЕРМИСЕ МЫШЕЙ *we/we wal/wal* НА E18.5

III.4.1. Количество зачатков волосяных фолликулов и плотность их распределения

В период эмбрионального развития в коже спины мыши на E18.5 закладываются все 4 типа ВФ. В литературе описано время закладки для каждого типа волос (Schlake, 2007; Fuchs, Nowak, 2008; Duverger, Morasso, 2009; Sennett, Rendl, 2012). Остевые ВФ закладываются в первую волну морфогенеза на E14 и на E18.5 представляют собой самые длинные зачатки ВФ на поздних стадиях морфогенеза 6-7. Шиловидные и пуховые ВФ закладываются во вторую волну морфогенеза на E16-17 и на E18.5 представляют собой зачатки ВФ на средних стадиях морфогенеза 2-5. ВФ типа зиг-заг закладываются последними в третью волну морфогенеза на E18-P1 и на E18.5 представляют собой плакody, соответствующие стадии 1 (рис. 31a).

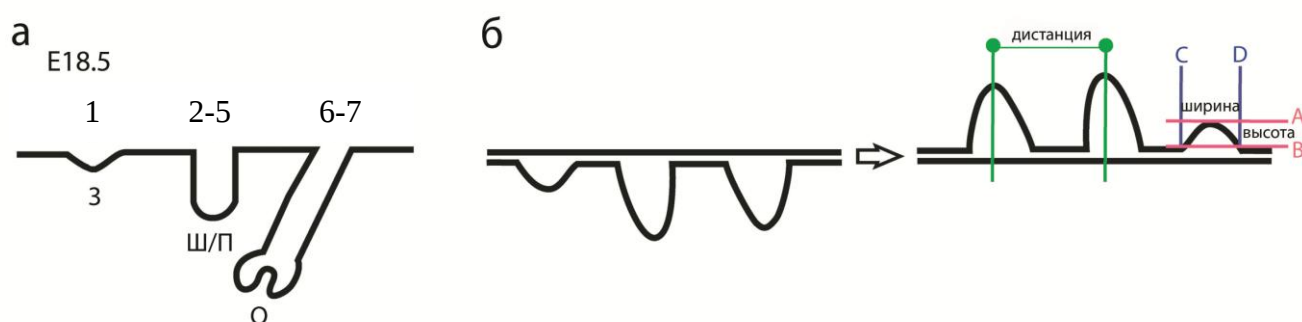


Рис.31. Схема тотального препарата эмбрионального эпидермиса спины на E18.5.

а) Схема эпидермиса мыши с указанием стадий развития разных типов ВФ на E18.5; б) Схема анализа тотального препарата эпидермиса E18.5 при микрофотографировании с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000. Расстояние от А до В соответствует высоте ВФ. Расстояние от С до D соответствует ширине в основании. О – остевые, Ш – шиловидные, П – пуховые, З – зиг-заг.

Анализ тотального препарата эпидермиса E18.5, окрашенного антителами против Р-кадгерина, с помощью флуоресцентного микроскопа позволяет отчетливо различить все 3 волны закладки ВФ как в норме, так и у мутантов. Зачатки ВФ ярко экспрессируют Р-кадгерин и выдаются над межфолликулярным эпидермисом. Остевые ВФ представляют собой самые длинные зачатки на поздних стадиях морфогенеза. Шиловидные и пуховые ВФ определяются в виде «столбиков» средней величины (средние стадии морфогенеза). Зиг-заг ВФ находятся на стадии плакод, которые представляют собой плотно упакованные клетки базального слоя выпуклой формы, ярко экспрессирующие Р-кадгерин (ранние стадии морфогенеза) (рис. 32a, а'). При этом на тотальном препарате эпидермиса мутантов *we/we wal/wal* плакody были большего размера по сравнению с контролем (рис. 32a'). Подсчет ВФ на тотальном препарате

показал, что число ВФ в эпидермисе мутантов *we/we wal/wal* в 1.5 раза меньше по сравнению с контролем (83 ± 3.82 SEM у мутантов по сравнению с 121 ± 3.36 SEM в контроле) (рис. 32б).

Чтобы оценить плотность распределения зачатков ВФ мы подсчитали расстояние между верхушками соседних ВФ (самая проксимальная часть растущего фолликула в нативном эпидермисе) (рис. 31б) на трехмерном изображении тотального препарата эпидермиса, которое получили с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000, используя его программное обеспечение (рис. 32в, в'). Если ВФ располагаются близко друг к другу, следовательно, дистанция между ними меньше и плотность на единицу площади выше. Подсчет среднего значения показал, что расстояние между ВФ в эпидермисе мутантов почти в 1.5 раза больше, чем между нормальными фолликулами (139.51 ± 7.51 SEM у мутантов по сравнению с 94.55 ± 6.94 SEM в контроле, μm) (рис. 32г).

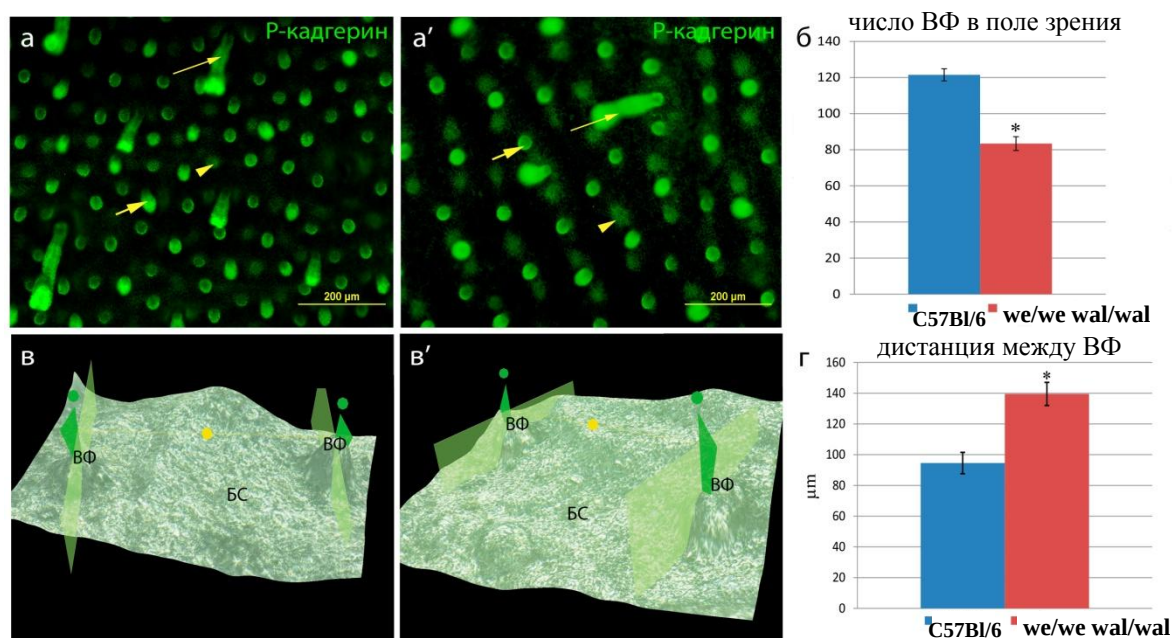


Рис.32. Характеристика плотности распределения ВФ в эмбриональном эпидермисе спины на E18.5.

а, в) эпидермис C57Bl/6; а', в') эпидермис *we/we wal/wal*; б) подсчет ВФ на тотальных препаратах эпидермиса, среднее значение; г) среднее расстояние между соседними ВФ; а, а') иммуногистохимия, окраска антителами против Р-кадгерина, флуоресцентная микроскопия; в, в') световая микроскопия, фиксированный препарат, контрастированный осмием. Длинная тонкая стрелка указывает на остевые ВФ, короткая стрелка – шиловидные/пуховые, наконечник стрелки – зиг-заг; БС – базальный слой; * – статистически значимо, $p < 0,05$.

Для проверки среднего значения дистанции был произведен дополнительный подсчет расстояния между ВФ на флуоресцентных снимках. Результат подтвердил увеличение дистанции в 1.5 раза между ВФ в эпидермисе *we/we wal/wal* по сравнению с C57Bl/6. Таким образом, ВФ в эпидермисе мутантов распределены редко, что подтверждает разницу в их количестве по сравнению с нормой. Несмотря на разницу в количестве, в мутантном эпидермисе присутствуют ВФ всех волн фолликулогенеза.

III.4.2. Параметры волосяных фолликулов: высота и ширина в основании

Трехмерное изображение тотального препарата эпидермиса, полученное с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000 с использованием его программного обеспечения, позволяет также измерить высоту ВФ, соответственно расстояние от точки А до точки В, которые лежат в горизонтальных плоскостях изображения объекта (рис. 31а, а', б, б').

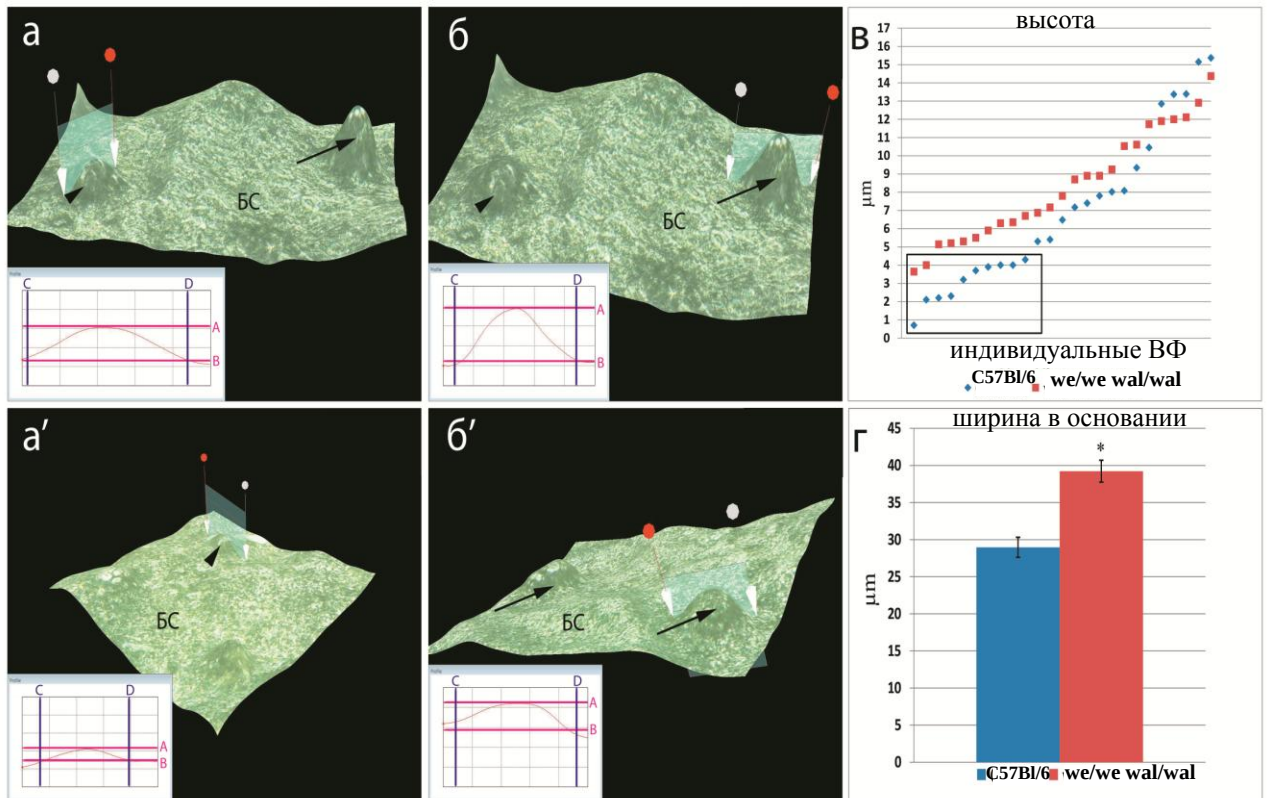


Рис.33. Морфометрические параметры ВФ в эмбриональном эпидермисе спины на E18.5.

а, б) эпидермис C57Bl/6; а', б') эпидермис we/we wal/wal; а, а') измерение ВФ на ранних стадиях развития; б, б') измерение ВФ на продвинутых стадиях развития; в) распределение высоты ВФ в порядке возрастания; г) среднее значение ширины в основании ВФ; а-б') световая микроскопия, изображение получено с помощью микроскопа Keyence VHX-1000, фиксированный препарат, контрастированный осмием. Расстояние от А до В соответствует высоте ВФ. Расстояние от С до D соответствует ширине в основании.

Черный квадрат – значения высоты до 4 мкм; короткая стрелка указывает на ранние стадии ВФ; длинная стрелка указывает на продвинутые стадии ВФ; БС – базальный слой; * – статистически значимо, $p < 0,05$

Ранние стадии развития ВФ (стадии 1-2, соответственно плакода и зачаток, согласно классификации Пауса (Paus et al., 1999)) мы принимали за небольшие выпуклости базального слоя, высотой не более 4 мкм (рис. 33а, а'). ВФ на более продвинутых стадиях развития идентифицировали как выпуклости в виде «столбиков» высотой до 16 мкм (рис. 33б, б'). Самые развитые ВФ, достигающие максимальной длины на E18.5 при подготовке препарата лежали горизонтально и присыхали к базальному слою. Поэтому, длинные ВФ остевого типа было

невозможно точно измерить. Этот тип исследования подходит для измерения морфометрических параметров шиловидных, пуховых и зиг-заг ВФ на E18.5. На гистограмме (рис. 33в) представлено распределение значений высоты ВФ в порядке возрастания. Полученные результаты показали, что наименьшие значения высоты практически не обнаруживаются в эпидермисе мутантов *we/we wal/wal* (рис. 33в), который, казалось, был лишен фолликулов на ранних стадиях морфогенеза.

Трехмерное изображение тотального препарата эпидермиса также позволяет измерить расстояние между точками контакта ВФ с межфолликулярным эпидермисом, соответственно расстояние от точки С до точки D, которые лежат в вертикальных плоскостях изображения объекта (рис. 31б). Это расстояние мы приняли за ширину в основании ВФ. Сравнительный анализ измерений показал, что в среднем ВФ мутанта шире в основании, чем контрольные ВФ (39.22 ± 1.47 SEM у мутантов по сравнению с 28.96 ± 1.35 в контроле, μm) (рис. 33г). Анализ параметров ВФ мышей C57Bl/6 показал, что ВФ на самых ранних стадиях 1-2 имеют наименьшую ширину в основании. Соответственно ВФ высотой до 4 мкм имели ширину в основании до 27 мкм. У мутантов такие маленькие значения ширины практически отсутствовали, что повлияло на среднее значение ширины в основании фолликулов.

Изучение тотального препарата эмбрионального эпидермиса позволяет быстро оценить плотность распределения и морфологию зачатков ВФ. Мы впервые применили тотальный препарат эмбрионального эпидермиса спины мыши для изучения и характеристики распределения ВФ. Мы предполагаем, что данный подход будет полезен для изучения и оценки распределения и морфологии ВФ и у других мутантных мышей с аномальным фенотипом волос и дефектами кожи. Данный подход позволяет оценить количество зачатков ВФ уже в эмбриогенезе и выявить аномалии структуры ВФ, если таковые имеются. Тотальный препарат эпидермиса в литературе использовали в экспериментах по изучению СК межфолликулярного эпидермиса человека (Jensen et al., 1999), СК, длительно сохраняющих метку ДНК (Braun et al., 2003), СК сальной железы (Frances, Niemann, 2012). Во всех вышеперечисленных исследованиях (Jensen et al., 1999; Braun et al., 2003; Frances, Niemann, 2012) использовали флуоресцентную микроскопию. Мы впервые применили возможности светового микроскопа для измерения величин ВФ на тотальном препарате эпидермиса, поскольку флуоресцентная микроскопия не позволяет измерить высоту всех типов ВФ и ширину в основании. К сожалению, остевые ВФ на поздних стадиях морфогенеза измерению на световом микроскопе Keyence VHX-1000 не подлежат, так как при высушивании препарата образуют структуры неправильной формы.

III.5. ФОРМИРОВАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО И МЕЗЕНХИМНОГО КОМПОНЕНТА ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ У ЭМБРИОНОВ E18.5 МЫШЕЙ *we/we wal/wal*

*III.5.1. Утолщения базального слоя у эмбрионов *we/we wal/wal**

Гистологические срезы, окрашенные эпителиальными маркерами Р-кадгерином и цитокератином 5 (K5), дают возможность оценить морфологию базального слоя и зачатков ВФ на разных стадиях развития. Р-кадгерин – трансмембранный белок, который относится к кальций-зависимым молекулам межклеточной адгезии, необходимым для формирования межклеточных контактов кератиноцитов в эпидермисе. Р-кадгерин экспрессируется в эмбриональном и постнатальном эпидермисе (Hirai et al., 1989). Цитокератин 5 (K5) – цитоплазматический белок промежуточных филаментов, экспрессирующийся в митотически активных (пролиферирующих) кератиноцитах базального слоя и зачатков ВФ (Devenport, Fuchs, 2008). Мы провели сравнительный анализ паттерна экспрессии Р-кадгерина и K5 в эмбриональном эпидермисе у мышей *we/we wal/wal* и контрольных мышей C57Bl/6.

В норме экспрессия Р-кадгерина ограничена базальным слоем кератиноцитов. Высокий уровень экспрессии (яркое свечение после окраски антителами) отмечают в плакодах и антериальной части зачатков ВФ (Devenport, Fuchs, 2008). При анализе паттерна экспрессии Р-кадгерина у мутантных мышей *we/we wal/wal* нами были обнаружены утолщения базального слоя (рис. 34а', в'). Утолщения базального слоя *we/we wal/wal* также обнаруживались при анализе экспрессии K5 на срезах кожи (рис. 34г'). Было видно, что число ВФ у мутантов гораздо меньше, чем в норме (рис. 34а, а'), что подтверждало наши данные, полученные при исследовании тотального препарата эпидермиса. Мы произвели подсчет зачатков ВФ на гистологических срезах. За ВФ принимали инвагинированные участки базального слоя с морфологией, характерной для ВФ. Аномальные утолщения, наблюдаемые в базальном слое эпидермиса мутантов в расчет не принимали, вследствие их нехарактерной морфологии. Подсчет среднего числа ВФ на гистологических срезах показал, что ВФ у мутантов в 4.6 раз меньше по сравнению с нормой (3.38 ± 0.19 SEM у мутантов по сравнению с 15.77 ± 0.54 SEM в поле зрения в контроле, n=48) (рис. 34б).

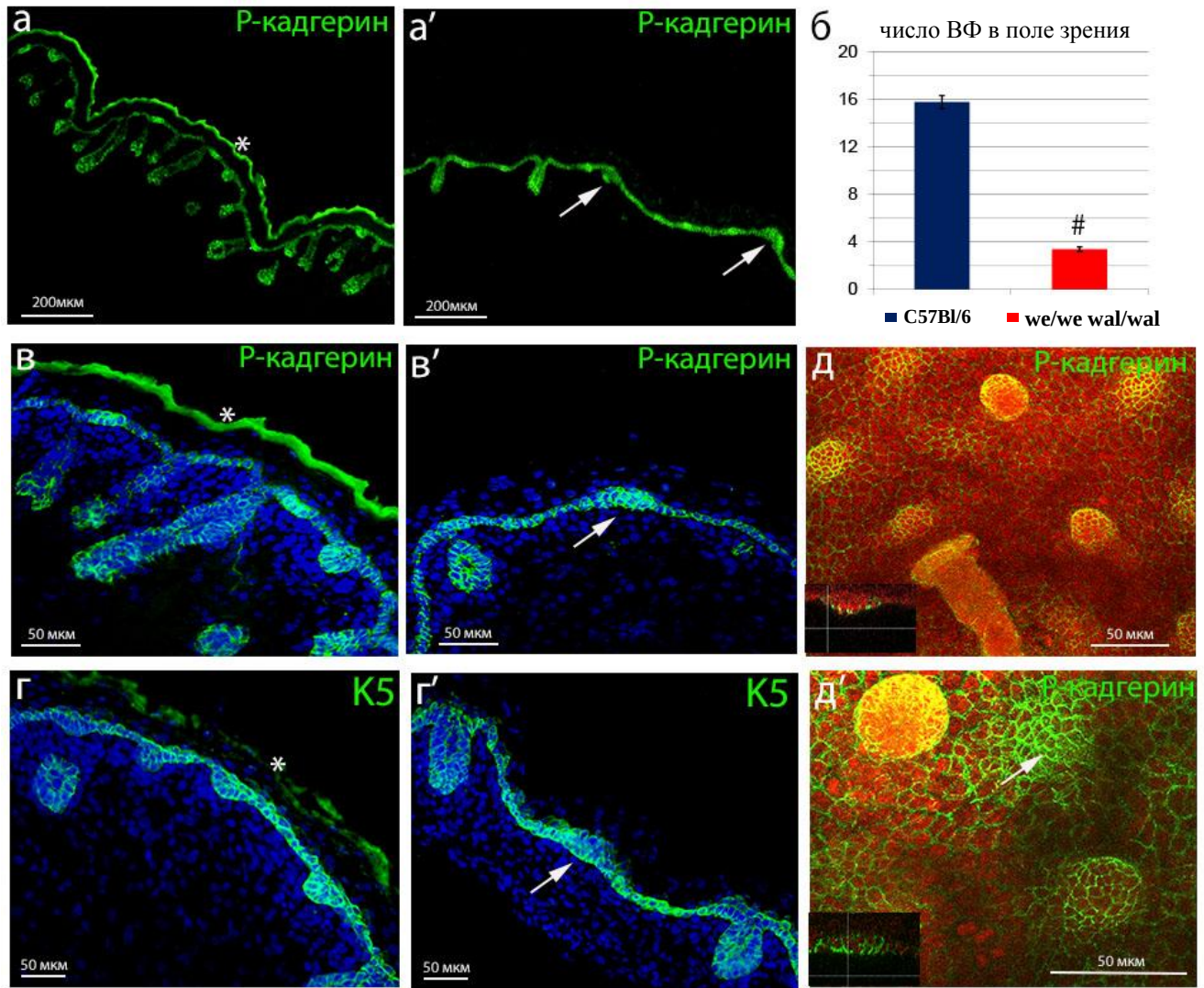


Рис.34. Экспрессия эпителиальных маркеров в эмбриональной коже спины на E18.5. а, в, г) срез кожи C57Bl/6; а', в', г') срез кожи *we/we wal/wal*; б) подсчет ВФ на срезах, среднее число ВФ в поле зрения; д) тотальный препарат эпидермиса C57Bl/6; д') тотальный препарат эпидермиса *we/we wal/wal*; д, д') максимальная проекция, врезка – оптический срез, конфокальная микроскопия; а, а', в, в', д, д') иммуногистохимия, окраска антителами против Р-кадгерина (зеленый), флуоресцентная микроскопия г, г') иммуногистохимия, окраска антителами против кератина 5 (зеленый), флуоресцентная микроскопия; в, в', г, г') ядра клеток докрашены DAPI (синий); д, д') ядра клеток докрашены ТОТ-3 (красный). Стрелка указывает на утолщения базального слоя; * – аутофлуоресценция рогового слоя; # – статистически значимо, $p < 0,05$

Различие в результатах подсчета ВФ, полученное на тотальном препарате и гистологических срезах объясняется тем, что на тотальных препаратах плотно упакованные базальные клетки (вид сверху) принимали за плакаты ВФ. На срезах кожи данные плотно упакованные базальные клетки не инвагинировали и не образовывали четкую структуру, напоминающую зачатки ВФ (вид сбоку), поэтому в расчет не принимались.

Это несоответствие особенно ясно проявляется при анализе конфокальных снимков эпидермиса мутантных мышей и сравнения его с контролем (рис. 34д, д'). На максимальной

проекции эпидермиса C57Bl/6, агрегаты ярко светящихся после окраски антителами против Р-кадгерина клеток принимали за плакоды. Оптические срезы данных плакод позволяли убедиться в этом предположении, так как на них видна четкая инвагинация базальных кератиноцитов, образующих плакоды (рис. 34д). На максимальной проекции эпидермиса *we/we wal/wal* мы обнаружили скопления ярко светящихся, плотно упакованных клеток, похожих на плакоды при наблюдении сверху. Однако, на оптических срезах было видно, что инвагинация у клеток, образующих данную структуру отсутствует и Р-кадгерин экспрессируется в нескольких слоях кератиноцитов (рис. 34д'). Отсутствие инвагинации некоторых плакод объясняет недостаток малых значений высот (до 4 мкм) при анализе тотального препарата эпидермиса с помощью светового микроскопа Keyence VHX-1000. Мутантные ВФ на ранних стадиях развития вследствие отсутствия инвагинации не образуют достаточного объема после подготовки препарата для световой микроскопии и не обнаруживаются как выпуклости базального слоя.

Следует также обсудить сниженное число ВФ в коже мутантов на E18.5. Данный факт может быть объяснен двояко. Либо на E18.5 происходит задержка образования ВФ, а в раннем постнатальном периоде закладывается недостающее количество ВФ и их число становится равным норме. Либо у мутантов закладывается меньше ВФ и недостающие ВФ так и не формируются. Мы попытались ответить на этот вопрос и посчитали число ВФ на гистологических срезах кожи на P1. Количество ВФ на P1 у мутантов достоверно не отличается от контроля (рис. 35). Этот результат дает нам возможность предположить, что морфогенез ВФ у мутантов скорее всего замедлен.

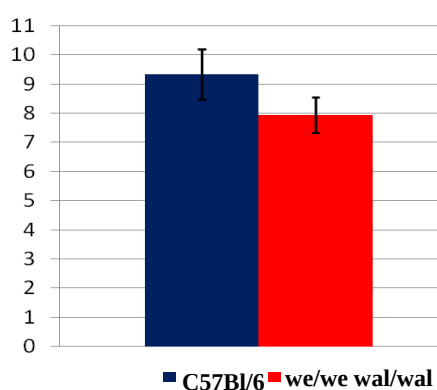


Рис.35. Подсчет ВФ на срезах кожи на P1. Среднее число ВФ в поле зрения, статистически не значимое различие, $p=0,21$

Обнаружение многослойных не инвагинирующих в дерму эпидермальных структур, поставило вопрос об их природе: можно ли отнести их к процессу фолликулогенеза?

III.5.2. Утолщения базального слоя – аномальные плакоды мутантных волосяных фолликулов

Чтобы определить, являются ли утолщения базального слоя мутантов ранней стадией образования ВФ или относятся к межфолликулярному эпидермису, мы проанализировали экспрессию маркера плакод, рецептора к эктодисплазину (EDAR) в эпидермисе у мутантных мышей *we/we wal/wal* в сравнении с контролем C57Bl/6.

В норме EDAR экспрессируется в инвагинирующих кератиноцитах плакоды и проксимальной части зачатков ВФ (Schmidt-Ullrich et al., 2001, 2006; Mustonen et al., 2004; Mou et al., 2006; Pummila et al., 2007; Zhang et al., 2009). Мы провели сравнение с контролем (рис. 36a) и обнаружили, что у мутантов экспрессия EDAR детектируется в нескольких слоях плотно упакованных кератиноцитов, образующих плакodu. При этом видно, что инвагинация кератиноцитов плакоды у мутантов отсутствует (рис. 36a'). Паттерн экспрессии EDAR в эпидермисе мутантов свидетельствует о том, что обнаруженные утолщения базального слоя представляют собой начальные стадии формирования ВФ.

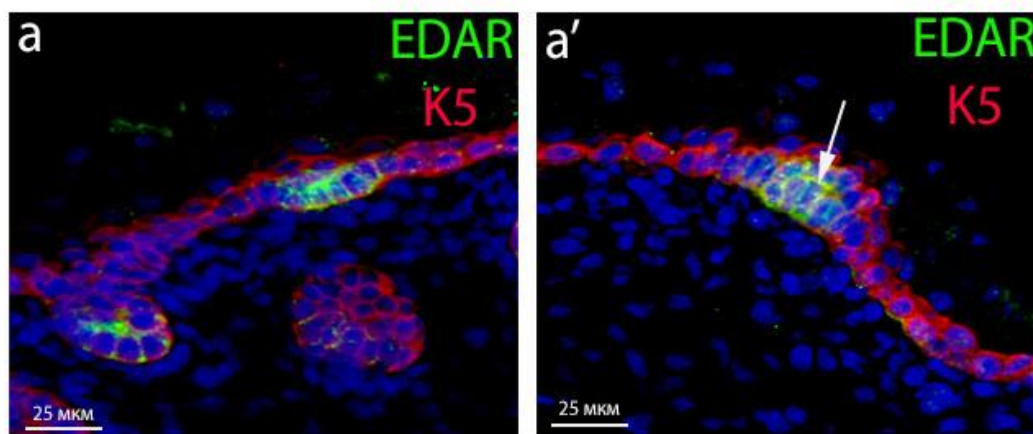


Рис.36. Экспрессия маркера плакод EDAR в эмбриональном эпидермисе на E18.5.

а) срез кожи C57Bl/6; а') срез кожи *we/we wal/wal*. Иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия, одновременная окраска антителами против кератина 5 (K5) (красный) и EDAR (зеленый), ядра клеток докрашены DAPI (синий). Стрелка указывает на утолщения базального слоя

Аномальная морфология некоторых мутантных плакод предполагает, что закладка ВФ у мутантов на E18.5 происходит с нарушением поляризации и инвагинации базальных кератиноцитов на ранних стадиях развития ВФ.

EDAR является рецептором к EDAA1. Связь лиганда с рецептором приводит к транслокации транскрипционного фактора NF-κB в ядро и активации его сигналинга в развивающихся плакодах. Мы обнаружили, что EDAR экспрессируется во всех типах ВФ на E18.5, следовательно можно предполагать, что сигнальный путь NF-κB активируется во всех

типах ВФ. Тем не менее, известна зависимость развития остевых, зиг-заг и ВФ хвоста от сигнального каскада EDA/EDAR/NF-κB, отсутствие которого не влияет на развитие вибрисс и шиловидных ВФ спины (Schmidt-Ullrich et al., 2001; Srivastava et al., 2001; Schmidt-Ullrich, Paus, 2005). Мутации, инактивирующие гены сигнального пути EDA/EDAR/NF-κB или супрессия активности NF-κB приводят к блокированию ранних стадий формирования остевых и зиг-заг ВФ, но не влияют на развитие шиловидных ВФ и вибрисс (Schmidt-Ullrich et al., 2006). С другой стороны, сверхэкспрессия EDAA1 приводит к формированию плакод увеличенного размера, дополнительных зубов и молочных желез. Аналогично, обработка эксплантатов эмбриональной кожи рекомбинантным EDAA1 оказывает дозозависимое влияние и вызывает увеличение размера плакод, вплоть до слияния соседних плакод (Mustonen et al., 2004).

Учитывая с одной стороны, задержку развития мутантных ВФ, а с другой, аномальную морфологию плакод, мы можем предположить некоторое нарушение сигнального пути EDA/EDAR/NF-κB. Вероятно, это может быть вызвано несколькими причинами: либо недостаточный синтез какого-либо из участников этого пути влияет на количество ВФ; либо, избыточный синтез EDAA1 определяет больший размер мутантных плакод, обнаруженных на тотальном препарате эпидермиса мутантов. Но следует отметить, что глобальных нарушений сигнального пути EDA/EDAR/NF-κB не происходит, так как все типы ВФ у зрелых особей *we/we* *wal/wal* были обнаружены и описаны выше.

III.5.3. Реализация сигнального пути WNT в деформированных мутантных зачатках волосяных фолликулов

Определяющим событием инициации фолликулогенеза является активация сигнального пути WNT (DasGupta, Fuchs 1999; Huelsken et al., 2001; Andl et al., 2002; Fuchs, 2007; Zhang et al., 2008; Fu, Hsu, 2012). Нашей задачей было установить связаны ли дефекты закладки ВФ у мутантов с нарушением сигнального пути WNT. Известно, что при активации сигнального пути происходит транслокация β -катенина в ядро и экспрессия транскрипционного фактора LEF1 (Zhou et al., 1995; Liu et al., 2004). Мы изучили паттерн экспрессии β -катенина и LEF1 в эмбриональной эпидермисе мутантов в сравнении с контролем. В аномальных, многослойных мутантных плакодах была обнаружена ядерная локализация β -катенина и LEF1 (рис. 37а', б').

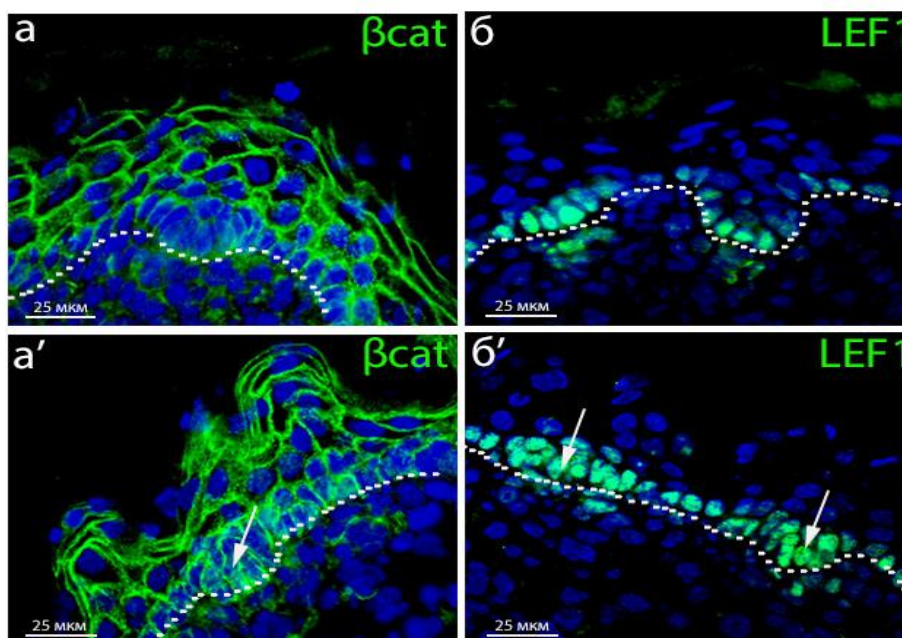


Рис.37. Экспрессия белков-мишеней сигнального пути WNT в эмбриональной коже E18.5. а, б) срез кожи C57Bl/6; а', б') срез кожи *we/we wal/wal*. Иммуногистохимия. Флуоресцентная микроскопия. а, а') окраска антителами против β -катенина (зеленый); б, б') окраска антителами против LEF1 (зеленый); а-б') Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Стрелка указывает на утолщения базального слоя; пунктир – граница раздела эпидермиса и дермы.

Поскольку характер локализации β -катенина и LEF1 в аномальных мутантных плакодах не отличается от нормы, по всей видимости, дефекты начальных стадий закладки мутантных ВФ не являются следствием нарушения сигнального пути WNT. Сигнальный путь WNT в мутантных плакодах реализуется.

Ядерная транслокация β -катенина необходима для инициации развития ВФ. Известно, что делеция β -катенина в эпидермисе приводит к остановке формирования плакод (Huelsen et al., 2001). Также было показано, что эктопическая экспрессия DKK1, ингибитора WNT, в

эпидермисе приводит к отсутствию формирования плакод (Andl et al., 2002). Этот результат указывает на первостепенную необходимость активации сигнального пути WNT для инициации образования плакод ВФ. Более того, при эктопической экспрессии DKK1 в эпидермисе отсутствовала экспрессия маркеров плакод, в частности β -катенина, LEF1 и EDAR (Andl et al., 2002). Из этого следует, что EDA/EDAR/NF- κ B сигнальный путь активируется после сигнального пути WNT. Более того, до сих пор не известен сигнал, который определяет локальную экспрессию EDAR, ограниченную плакодами. Возможно, им может быть WNT. Другие исследования также свидетельствуют, что сигнальный путь EDA/EDAR/NF- κ B является мишенью каскада WNT и активируется вскоре после него (Zhang et al., 2009). Но также было отмечено, что сигнальный путь NF- κ B активирует канонический сигнальный путь WNT и необходим для сохранения, поддержания и усиления его активности (Andl et al., 2002; Fliniaux et al., 2008; Zhang et al., 2009; Cui et al., 2010). Обнаружение экспрессии β -катенина, LEF1 и EDAR в мутантных плакодах свидетельствует об отсутствии критических нарушений в активации этих каскадов.

Принципы самоорганизации и распределения плакод ВФ в эмбриогенезе до сих пор во многом остаются загадкой биологии ВФ. Основной принятой в качестве парадигмы гипотезой является модель кратковременной активации и долгосрочного ингибирования, предложенная Alan Turing (Turing, 1952), известная также как модель локальной активации и латерального ингибирования. WNT и его ингибитор DKK рассматриваются в качестве первичных детерминант размещения ВФ. Было показано, что избыточная экспрессия DKK снижает общую плотность ВФ, а умеренное подавление эндогенной активности сигнального пути WNT приводит к образованию кластеров ВФ (Sick et al., 2006). С помощью компьютерного прогнозирования модели локальной активации и латерального ингибирования также было показано, что умеренная избыточная экспрессия ингибитора DKK в ходе первой волны индукции ВФ увеличивает межфолликулярное расстояние (Sick et al., 2006).

Учитывая увеличение дистанции между ВФ мутантов по сравнению с контролем на тотальном препарате эпидермиса, можно предположить, что в коже мутантов увеличена экспрессия ингибитора, который препятствует инициации фолликулогенеза.

III.5.4. Характер образования дермального компонента мутантных волосяных фолликулов

Развитие ВФ – результат непрерывного, реципрокного взаимодействия эпидермиса и дермы (Millar, 2002; Fuchs, 2007). Начиная с инициации фолликулогенеза и до формирования зрелого ВФ, дермальный компонент ВФ преобразуется от ДК до ДП и соединительно-тканного чехлика (Paus et al., 1999). Эффективный взаимообмен сигнальными молекулами между эпидермальным и дермальным компонентами является необходимым условием не только успешного морфогенеза, но и регенерации ВФ. Считается, что дермальные клетки являются индукторами, а эпителиальные – воспринимающими индукцию клетками в процессе формирования ВФ (Hardy, 1992; Schmidt-Ullrich, Paus, 2005). Однако, результаты некоторых исследований говорят в пользу первенства эпителиальных клеток в качестве индукторов образования ВФ (Nuh et al., 2013). Обмен сигнальными каскадами между этими двумя типами клеток является взаимным и невероятно сложным процессом. Формирование полноценной ДП необходимое условие успешного морфогенеза ВФ и его регенерации в постнатальном периоде. Размер ДП определяет размер ВФ (Chi et al., 2013).

Мы исследовали формирование ДК и ДП у мутантов по сравнению с нормой с помощью анализа экспрессии их белков-маркеров – щелочной фосфатазы (AP), рецептора к нейротропину p75 (Botchkareva et al., 1999), транскрипционного фактора SOX2 (Driskell et al., 2009) и LEF1 (DasGupta, Fuchs, 1999). В норме в эмбриональной коже AP, SOX2, p75 экспрессируются клетками ДК и ДП (рис. 38а, в, г). LEF1 экспрессируется как в ВФ, так и в ДК и ДП (рис. 38б).

В коже мутантов у нормально развитых ВФ наблюдается формирование нормальной AP+ ДП. Однако, также четко детектируется диффузная экспрессия AP во всей папиллярной дерме (рис. 38а'). Обнаруживаются группы ярко окрашенных AP+ клеток, подобных ДП при отсутствии видимых признаков инвагинации базальных кератиноцитов (рис. 38а''). Характер экспрессии LEF1 в коже мутанта был подобен паттерну экспрессии AP (рис. 38б', б'').

Экспрессия маркеров ДП SOX2 и p75 у мутанта была аналогичной. Помимо нормальной ДП, рядом с нормально развитым ВФ (рис. 38в', г'), наблюдали SOX2+ и p75+ агрегаты клеток при отсутствии видимых признаков фолликулогенеза (рис. 38в'', г''). В коже мутантов экспрессия AP и p75 также обнаруживалась в фибробластах вокруг фолликулов в большей степени, чем в контроле. Мы обнаружили, что p75 у мутантов экспрессируется большим числом фибробластов по сравнению с контролем. Вероятно, размеры ДП, судя по экспрессии p75, у мутантов иногда были значительно больше, чем в контроле (рис. 38г', г'').

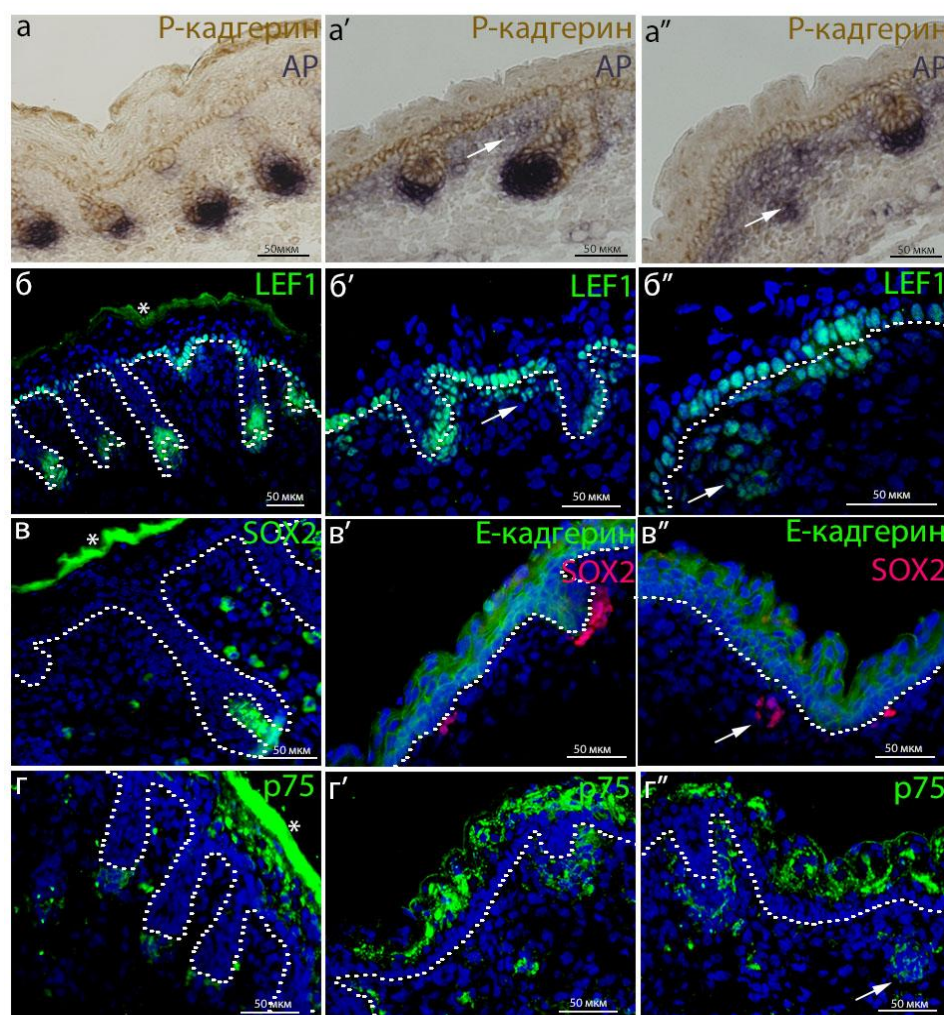


Рис.38. Экспрессия маркеров дермального компонента ВФ в эмбриональной коже на E18.5. а-г) срез кожи C57Bl/6; а'-г'; а''-г'') срез кожи *we/we* *wal/wal*. Иммуногистохимия. Флуоресцентная микроскопия. а, а', а'') одновременная окраска антителами против Р-кадгерина (коричневый) и AP (фиолетовый); б, б', б'') окраска антителами против LEF1 (зеленый); в) окраска антителами против SOX2 (зеленый); в', в'') одновременная окраска антителами против Е-кадгерина (зеленый) и SOX2 (красный); г, г', г'') окраска антителами против p75 (зеленый); б-г'') ядра клеток докрашены DAPI (синий). Стрелка указывает на ДП-подобные агрегаты клеток; пунктир – граница раздела эпидермиса и дермы; * – аутофлуоресценция рогового слоя. Величина шкалы – 50 мкм.

Морфологически клетки ДК и ДП схожи с фибробластами дермы, однако отличаются по экспрессии специфических сигнальных молекул и компактизации в начале морфогенеза ВФ, которая завершается формированием сферических структур ДП. Одним из маркеров клеток ДП является активность AP, уровень которой коррелирует с индукционными свойствами этих клеток (McElwee et al., 2003). Так, например, культивированные клетки ДП с высокой активностью AP способны индуцировать формирование ВФ при пересадке в кожу, лишенную волос, в то время как клетки, утратившие экспрессию AP, теряют эту способность (McElwee et al., 2003).

При анализе экспрессии маркеров дермального компонента мутантных ВФ мы обнаружили, что папиллярная дерма чрезмерно синтезирует AP и LEF1. Данный факт позволяет предполагать, что мутантная дерма обладает индуктивной способностью. Судя по интенсивности окраски, индуктивная активность мутантной дермы превышает норму. Однако, в эпидермисе в это время происходит задержка фолликулогенеза. В то же время, вероятно, эпидермис не способен синтезировать ингибитор, который бы ограничивал экспрессию маркеров ДП строго под ВФ. В результате, вся папиллярная дерма мутантов обладает индуктивной активностью и четкое место экспрессии (под зачатком ВФ) не соблюдается.

Механизмы спецификации ДК до сих пор полностью не определены. Предполагают, что формирование ДК происходит под воздействием некоторых факторов, выделяемых плакодами ВФ. Например, при нокауте *Fgf20* в эпидермисе ДК первичных и вторичных ВФ не образуется (Nuh et al., 2012). Кроме диффузной экспрессии в папиллярной дерме белков-маркеров ДП, таких как AP и LEF1 были обнаружены агрегаты ДП-подобных клеток, положительных по всем исследуемым маркерам, а именно: AP, LEF1, SOX2 и p75 в отсутствии признаков фолликулогенеза. Этот факт подразумевает более сложную иерархию обмена сигналами эпидермиса и дермы. Полученные нами результаты поднимают новые вопросы о природе «первичного сигнала» в фолликулогенезе.

III.6. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЭПИДЕРМИСА ЭМБРИОНОВ E18.5 МЫШЕЙ *we/we wal/wal*

III.6.1. Прлиферация супрабазальных кератиноцитов *we/we wal/wal*

Формирование эпидермиса в эмбриогенезе мыши начинается с E8.5. Эпидермис образуется из одного слоя эктодермальных клеток. В дальнейшем происходит дифференциация и стратификация эмбрионального эпидермиса. В результате стратификации образуется многослойный эпидермис, состоящий из четырех типов клеток. Базальный слой образован одним рядом базальных кератиноцитов, которые экспрессируют цитокератины 5/14, контактируют с БМ и характеризуются высоким пролиферативным потенциалом. Шиповатый слой расположен над базальным слоем и образован несколькими рядами супрабазальных шиповатых кератиноцитов, экспрессирующих кератины 1/10, которые образуют более крепкие кератиновые филаменты и связываются десмосомами. Над шиповатым слоем далее формируются гранулярный и ороговевающий слои (Koster, Roop, 2007).

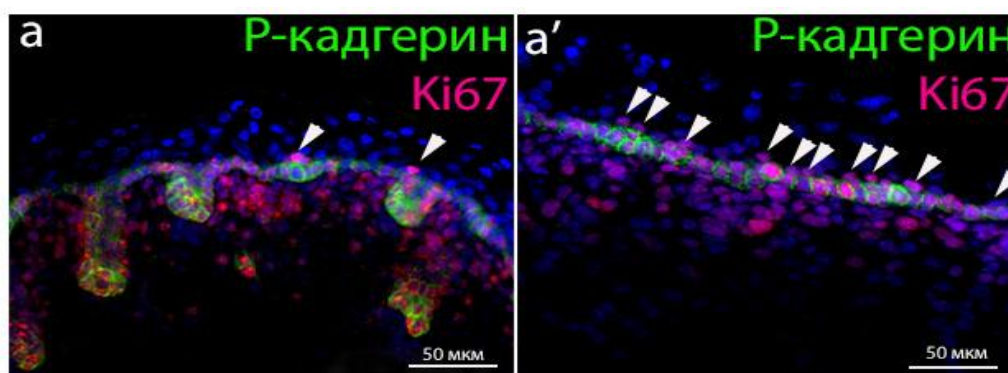


Рис.39. Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в эмбриональной коже на E18.5. а) срез кожи C57Bl/6; а') срез кожи *we/we wal/wal*. Иммуногистохимия. Флуоресцентная микроскопия. Одновременная окраска антителами против Р-кадгерина (зеленый) и Ki67 (красный). Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Наконечники стрелки указывают на пролиферирующие супрабазальные клетки.

Чтобы исследовать формирование полноценной структуры эмбрионального эпидермиса у мутантов, следовало проанализировать процессы дифференциации и стратификации. Известно, что процесс терминальной дифференциации начинается с выхода базальных кератиноцитов из клеточного цикла и утраты адгезии к БМ. Изучив экспрессию маркера пролиферирующих клеток Ki67, мы обнаружили, что в норме Ki67+ кератиноциты детектируются в базальном слое и крайне редко – в супрабазальном (рис. 39а). У мутантов количество Ki67+ супрабазальных кератиноцитов было значительно больше, чем в норме (рис. 39а'). Следует отметить, что Ki67+ супрабазальные кератиноциты уже не синтезируют Р-кадгерин, маркер базальных кератиноцитов, следовательно, не относятся к базальному слою, но не утрачивают митотическую активность. Данное наблюдение навело нас на мысль, что в

формировании шиповатого слоя могут происходить изменения. Поэтому мы решили проверить, соответствует ли норме характер экспрессии маркера супрабазальных кератиноцитов кератина 1 (K1) в эпидермисе мутантов. Мы не обнаружили различий в паттерне экспрессии K1 в эпидермисе мутантов по сравнению с контролем. Как видно на рис. 40 красная полоса шиповатого слоя, окрашенная антителами против K1, начинается без промежутков после базального слоя, окрашенного антителами против Р-кадгерина в зеленый цвет (рис.40).

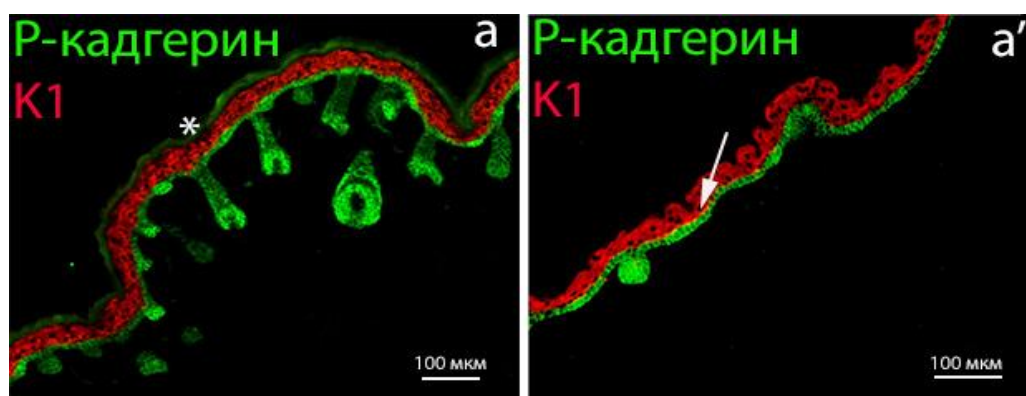


Рис.40. Экспрессия маркера супрабазальных кератиноцитов K1 в эмбриональной эпидермисе на E18.5; а) срез кожи C57Bl/6; а') срез кожи *we/we wal/wal*. Иммуногистохимия. Флуоресцентная микроскопия. Одновременная окраска антителами против Р-кадгерина (зеленый) и K1 (красный). Стрелка указывает на супрабазальное положение клетки;

* – аутофлуоресценция рогового слоя.

Повышенная пролиферация супрабазальных кератиноцитов указывает на замедление процесса дифференциации и свидетельствует о нарушении баланса пролиферации и дифференциации в формирующемся эпидермисе мутантов.

В литературе описаны четкие сроки стратификации и формирования слоев кератиноцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки. В начале стратификации (E12.5–E15.5) в эпидермисе мыши все еще можно обнаружить супрабазальные пролиферирующие клетки. Поскольку в это время запускается программа стратификации, вероятно, наличие делящихся клеток в супрабазальном положении объясняется быстрым увеличением стратифицирующихся слоев по мере роста эмбриона. Однако, эти супрабазальные клетки вскоре дифференцируются. Стратификация полностью завершается к E17.5, хотя местами все еще можно обнаружить редкие пролиферирующие супрабазальные клетки. К этому моменту в эпидермисе формируются 4 слоя кератиноцитов (Blanpain, Fuchs, 2009).

Вероятно, усиление пролиферации в супрабазальном слое указывает на задержку дифференциации и стратификации. Это предположение подкрепляется отсутствием рогового слоя в мутантном эпидермисе E18.5, что будет обсуждаться далее.

III.6.2. Аномалии базальной мембраны эмбриональной кожи мутантов

Как известно, БМ входит в состав ниши для базальных кератиноцитов, определяет их полярность и недифференцированный статус. Открепление кератиноцитов от БМ запускает программу стратификации и дифференцировки. Экспрессия белков БМ перлекана и ламинина 5 в норме ограничена линией БМ (рис. 41а, б). В коже мышей *we/we wal/wal* на E18.5 в утолщениях базального слоя экспрессия ламинина 5 и перлекана была обнаружена по всей поверхности базальных кератиноцитов (рис. 41а', б').

Интегриновые рецепторы $\beta 1$ экспрессируются базальными кератиноцитами, в основном, в базолатеральном домене для взаимодействия с белками БМ (рис. 41в) (Adams, Watt, 1991; Hertle et al., 1991; Jensen et al., 1999). Сигнальный каскад, осуществляемый $\beta 1$ интегринами, критичен для поддержания пролиферативного потенциала эпидермиса, успешного развития и гомеостаза ВФ (Raghavan et al., 2000; Brakebusch et al., 2000). В связи с нарушениями синтеза БМ у мышей *we/we wal/wal*, представляло интерес определение характера экспрессии интегриновых рецепторов. Интегрины $\beta 1$ в утолщениях базального слоя у мутантов экспрессировались по всей поверхности базальных кератиноцитов (рис. 41в').

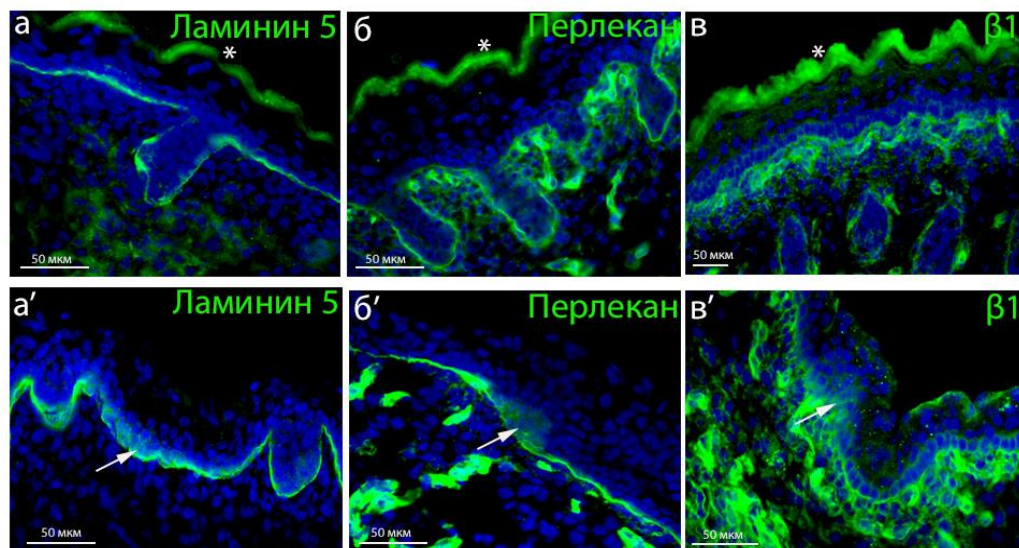


Рис.41. Экспрессия белков БМ и интегринов $\beta 1$ в эмбриональной коже на E18.5. а, б, в) срез кожи C57Bl/6; а', б', в') срез кожи *we/we wal/wal*; Иммуногистохимия. Флуоресцентная микроскопия. а, а') окраска антителами против ламинина 5 (зеленый); б, б') окраска антителами против перлекана (зеленый); в, в') окраска антителами против интегринов $\beta 1$ (зеленый); а-в') ядра клеток докрашены DAPI (синий). Величина шкалы – 50 мкм.

Стрелка указывает на утолщения базального слоя; * – аутофлуоресценция рогового слоя.

Диффузная экспрессия белков БМ и интегриновых рецепторов $\beta 1$ в утолщениях базального слоя мутантов позволяет предположить отсутствие идентификации кератиноцитами своего «базального» статуса и, следовательно, нарушение апико-базальной ориентации.

Интегриновые рецепторы $\beta 1$ необходимы для апикальной локализации белкового комплекса, который регулирует правильную ориентацию веретена деления и асимметричное деление эпидермальных прогениторных клеток. Поляризованное состояние кератиноцитов обеспечивает баланс между СК и прогениторными клетками, лежащими на БМ и их дифференцированными потомками, принимающими супрабазальное положение (Lechler, Fuchs; 2005). В утолщениях базального слоя у мутантов наблюдается, таким образом, нарушение структуры эпидермиса, а также процесса стратификации.

III.6.3. Стратификация и ороговение эмбрионального эпидермиса *we/we wal/wal*

Супрабазальные слои эпидермиса образованы несколькими рядами кератиноцитов на разных стадиях дифференцировки. Над однорядным базальным слоем кератиноцитов располагается несколько рядов клеток шиповатого слоя, которые экспрессируют цитокератины 1/10. Затем следуют гранулярный, клетки которого экспрессируют белки предшественники ороговения лорикрин и инволюкрин, и ороговевающий слой (Koster, Roop, 2007). На E18.5 в эпидермисе сформированы все 4 слоя кератиноцитов. На гистологических срезах кожи E18.5, окрашенных гематоксилином и эозином, в норме ороговевающий слой детектируется в виде слущивающейся «ленты», а при иммуногистохимической окраске – аутофлуоресцирует. Такого слущивающегося или аутофлуоресцирующего рогового слоя в эпидермисе мутантов мы не наблюдали (рис. 42а', б', в').

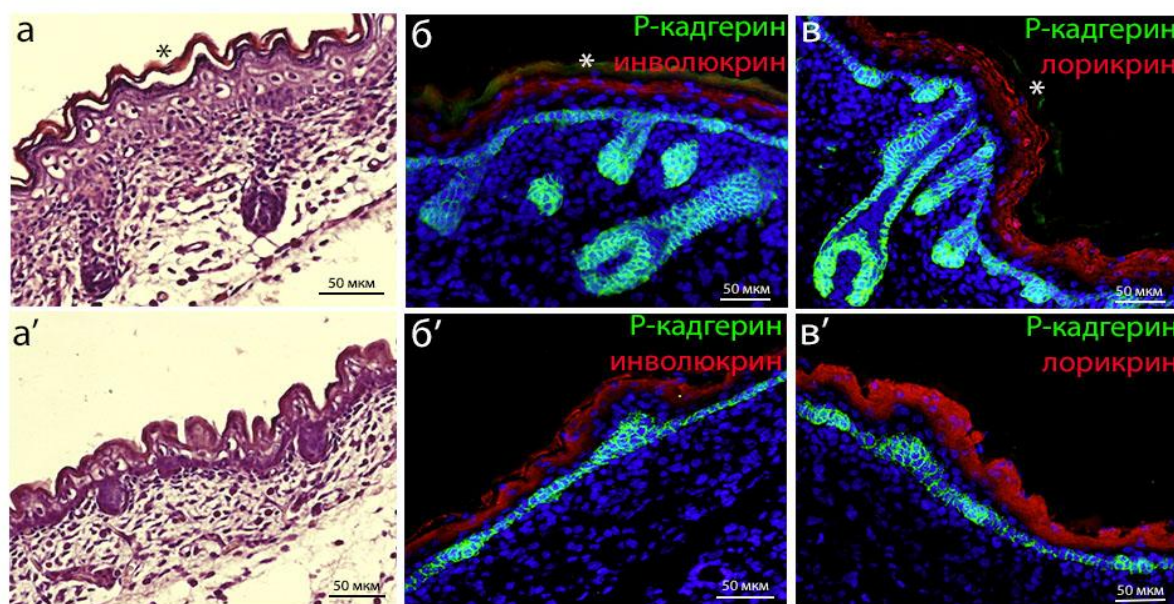
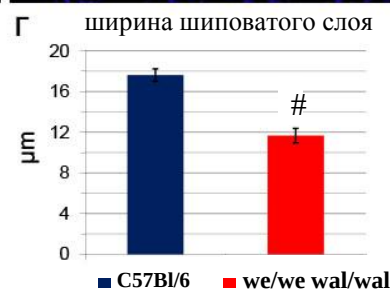


Рис.42. Экспрессия маркеров гранулярного слоя в эмбриональном эпидермисе на E18.5.

а, б, в) срез кожи C57Bl/6; а', б', в') срез кожи *we/we wal/wal*; а, а') гистология, световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином; б, б') одновременная окраска антителами против Р-кадгерина (зеленый) и инволюкрина (красный); в, в') одновременная окраска антителами против Р-кадгерина (зеленый) и лорикрина (красный); г) толщина шиповатого слоя в мкм; б, б', в, в') иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия, ядра клеток докрашены DAPI (синий);

* – роговой слой; # – статистически значимо, $p < 0,05$.



Экспрессия маркеров гранулярного слоя, белков, необходимых для ороговения кератиноцитов – инволюкрина и лорикрина, у мутантов не отличается от контроля (рис. 42б',

в'). Однако, на E18.5 у мутантов эпидермис выглядит тоньше (рис. 42а'), отсутствует роговой слой (рис. 42а', б', в') и значительно меньше число клеток в шиповатом слое (1-2 клетки у мутантов по сравнению с 3-4 клетками в контроле) при окраске гранулярного и базального слоя (рис. 42б', в'). Определение среднего значения высоты шиповатого слоя (расстояние между базальным и гранулярным слоем) на срезах показало, что шиповатый слой у мутантов в 1.5 раза тоньше, чем в контроле (11.66 ± 0.71 SEM у мутантов по сравнению с 17.61 ± 0.61 SEM в контроле, μm , $n=34$) (рис. 42г). На препаратах с одновременно окрашенным базальным слоем антителами против Р-кадгерина и гранулярным слоем антителами против лорикрина или инволюкрина на протяжении среза встречались места, где гранулярный слой, окрашенный красным, почти соприкасался с базальным слоем, окрашенным зеленым, следовательно, шиповатый слой, расположенный между ними, был очень тонким. Как правило, шиповатый слой мутантного эпидермиса, ядра которого окрашены красителем DAPI в синий цвет, был толщиной в 1-2 клетки, но встречались также места над утолщениями базального слоя, где высота шиповатого слоя резко возрастала (рис. 42б', в'). Утончение шиповатого слоя мутантного эпидермиса и отсутствие ороговения на E18.5 указывает на задержку дифференциации. Косвенно этот факт подтверждается усилением пролиферации супрабазальных клеток, что показано ранее.

Одной из вероятных причин нарушения дифференциации и отсутствия рогового слоя мутантного эпидермиса E18.5 может быть нарушение/отсутствие синтеза трансглутаминаз. Трансглутаминазы (TGM) – ферменты, катализаторы формирования ковалентных связей между глутамином и остатками лизина в белках, необходимые для стабилизации ВКМ, формирования и укрепления эпидермального барьера. Дифференциальная локализация эпидермальных трансглутаминаз соответственно стадии дифференциации кератиноцитов и их расположение внутри клетки в сочетании с использованием различных субстратов определяет высокую специфичность этих ферментов в процессе кератинизации.

Анализ участка 2-й хромосомы, в котором находится группа сцепления гена *we* позволил определить гены, которые, возможно, являются нормальными аллелями изучаемой мутации. Из всех генов, картированных на участке второй хромосомы в группе сцепления гена *we*, вероятными кандидатами на роль нормального аллеля мутантного гена *we* являются гены: трансглутаминаза 3 (*Tgm3*) и трансглутаминаза 6 (*Tgm6*) (Нестерова, 2010). О TGM 6 известно очень мало, но показано, что она активна в эпидермисе (Fukui et al., 2013) и ВФ кожи спины мыши (John et al., 2012).

TGM3 – растворимый фермент, синтезируемый преимущественно дифференцированными кератиноцитами, корнеоцитами и клетками ВФ (Hitomi et al., 2001). Субстратами для TGM в дифференцированных кератиноцитах служат инволюкрин и лорикрин

(Candi et al., 1995). Трихогиалин – богатый глутамином белок, экспрессируется в специализированных эпителиальных структурах с высокой механической прочностью (O’Keefe et al., 1993), например, таких как внутреннее корневое влагалище. Трихогиалин является субстратом для TGM3. TGM3 ответственна за сшивку трихогиалина с кератиновыми филаментами в значительно большей степени, чем TGM1 и 2, которые также синтезируются во внутреннем корневом влагалище (Tarcza et al., 1997; Steinert et al., 2003). Сравнительно недавно изучение *Tgm3*^{-/-} мышей показало, что у них нет очевидных дефектов в развитии кожи, в формировании эпидермального барьера к моменту рождения и ранозаживлении у взрослых особей (John et al., 2012). Однако, отсутствие TGM3 повлияло на структуру волос. Стержни волос мехового покрова и вибриссы мышей *Tgm3*^{-/-} были тонкие, извитые и деформированные, клетки кутикулы волоса нарушены. Следует отметить, что формирование эпидермального барьера у эмбрионов *Tgm3*^{-/-} задерживалось и на E17.5 краситель толуидиновый синий еще проникал в их кожу, в отличие от контрольных эмбрионов. Но к моменту рождения барьер формировался (John et al., 2012).

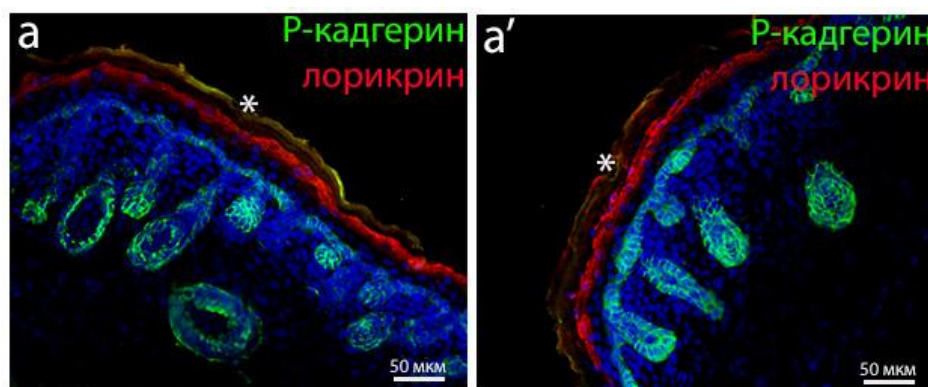


Рис.43. Формирование рогового слоя в эпидермисе на P1. а) срез кожи C57Bl/6; а') срез кожи *we/we wal/wal*. Иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия, одновременная окраска антителами против Р-кадгерина (зеленый) и лорикрина (красный), ядра докрашены DAPI (синий); * – аутофлуоресценция рогового слоя.

Мы обнаружили отсутствие рогового слоя на E18.5 у мышей *we/we wal/wal*. Однако, необходимо было определить, формируется ли роговой слой к моменту рождения. Мы проанализировали срезы кожи *we/we wal/wal* и C57Bl/6 на P1 и не обнаружили видимых изменений. Ширина шиповатого слоя визуальнo соотносилась с таковой в контроле, и аутофлуоресцирующий роговой слой присутствовал (рис. 43а, а'). Согласно нашим результатам эпидермальный барьер у мышей *we/we wal/wal*, подобно мышам *Tgm3*^{-/-}, к моменту рождения формируется. Таким образом, можно утверждать, что у *we/we wal/wal* происходит задержка стратификации и ороговения.

В пользу гена *Tgm3* как кандидата нормальной аллели мутантного гена *we* можно отнести нарушение кератинизации клеток внутреннего корневого влагалища и структуры

трихогиалиновых гранул мышей *we/we* (Конюхов, Куприянов, 1990) и косвенно задержку формирования рогового слоя эмбрионов мышей *we/we wal/wal*. Однако, эти нарушения могут также относиться и к возможным проявлениям мутантного аллеля гена *Tgm6*.

III.7. ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ МЫШЕЙ *we/we wal/wal* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

III.7.1. Пролиферация в культуре первичных кератиноцитов

В супрабазальном слое эмбрионального эпидермиса *we/we wal/wal in situ* было выявлено множество пролиферирующих кератиноцитов. Этот факт свидетельствует о том, что пролиферативная активность эмбрионального эпидермиса *we/we wal/wal* выше, чем в норме. Мы попытались проверить этот факт в культуральных условиях.

Анализ пролиферации проводили в культуре первичных кератиноцитов E18.5. Для этого в субконфлуэнтном монослое подсчитали количество кератиноцитов, экспрессирующих Ki67 (рис. 44а, а'). Этот белок синтезируется в клетках в фазах клеточного цикла G1, S, G2 и M, но отсутствует в покоящихся клетках (в фазе G0).

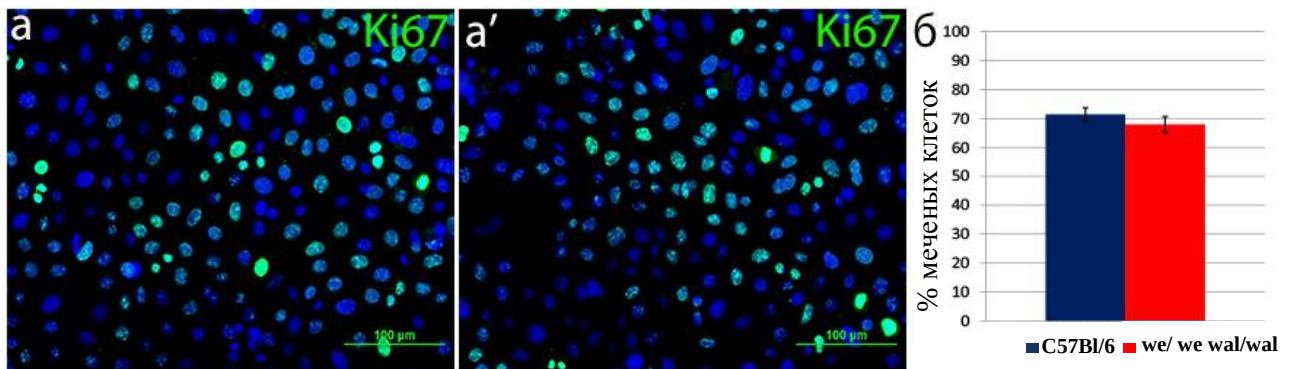


Рис.44. Экспрессия Ki67 *in vitro* в кератиноцитах, полученных из эпидермиса на E18.5.

а) C57Bl/6; а') *we/we wal/wal*; б) соотношение клеток Ki67+ в обеих культурах в процентах, статистически не значимое различие, $p=0,53$. Иммуноцитохимия, флуоресцентная микроскопия, окраска антителами против Ki67 (зеленый), ядра клеток докрашены DAPI (синий). Величина шкалы – 100 мкм.

Подсчет Ki67-положительных клеток в обеих культурах кератиноцитов показал отсутствие статистически значимого различия в пролиферации между кератиноцитами *we/we wal/wal* и C57Bl/6 в условиях *in vitro* (рис. 44б).

Нам не удалось наблюдать увеличение пролиферации клеток в культуре подобно увеличению числа пролиферирующих супрабазальных мутантных кератиноцитов в эпидермисе эмбрионов E18.5.

III.7.2. Доля кератиноцитов в фазе S клеточного цикла

Маркер пролиферации Ki67 синтезируется в клетках на всех стадиях клеточного цикла, кроме стадии покоя. Чтобы выявить популяцию клеток, пребывающих исключительно в фазе синтеза, используют включение синтетических нуклеозидов.

Для выявления клеток, находившихся в фазе синтеза ДНК, в культуру первичных кератиноцитов внесли аналог тимидина, BrdU на 2 ч. Затем с помощью иммуногистохимического анализа выявили клетки, включившие метку (рис. 45а, а').

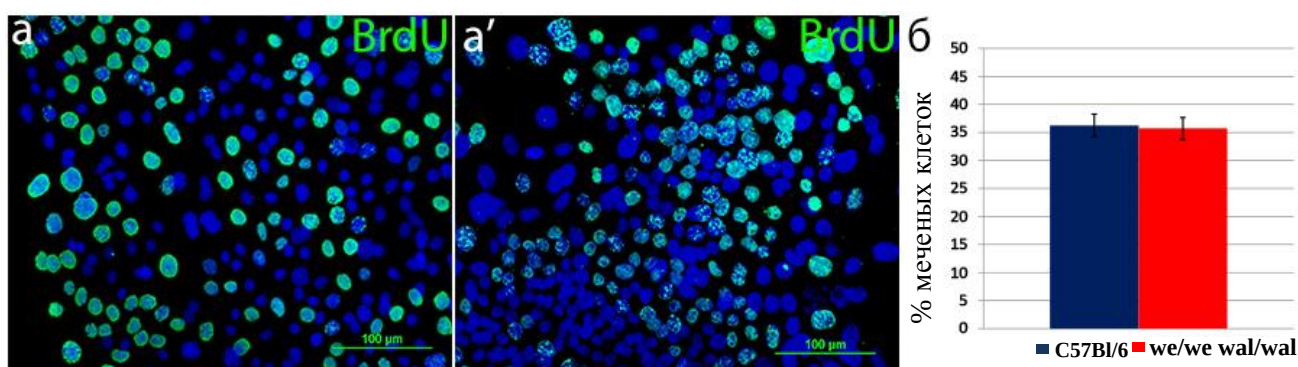


Рис.45. Включение BrdU *in vitro* первичными эмбриональными кератиноцитами. а) C57Bl/6; а') we/we wal/wal; б) соотношение клеток BrdU+ в обеих культурах в процентах, статистически не значимое различие, $p=0,87$. Иммуноцитохимия, флуоресцентная микроскопия, окраска антителами против BrdU, ядра клеток докрашены DAPI.

Количество BrdU-положительных клеток в культуре эмбриональных кератиноцитов we/we wal/wal статистически не значимо отличается от C57Bl/6 (рис.45б).

III.7.3. Распределение кератиноцитов по фазам клеточного цикла

Чтобы определить соотношение клеток на разных стадиях клеточного цикла в культуре кератиноцитов *we/we wal/wal* и C57Bl/6 мы инкубировали культивированные клетки с пропидий йодидом (PI) и применили метод проточной цитофлуориметрии. PI – интеркалирующий агент, окрашивающий ДНК. Включение PI в культуру клеток позволяет количественно оценить содержание ДНК в клетках. С помощью проточной цитофлуориметрии мы разделили культуру первичных кератиноцитов на популяции клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла и апоптозе.

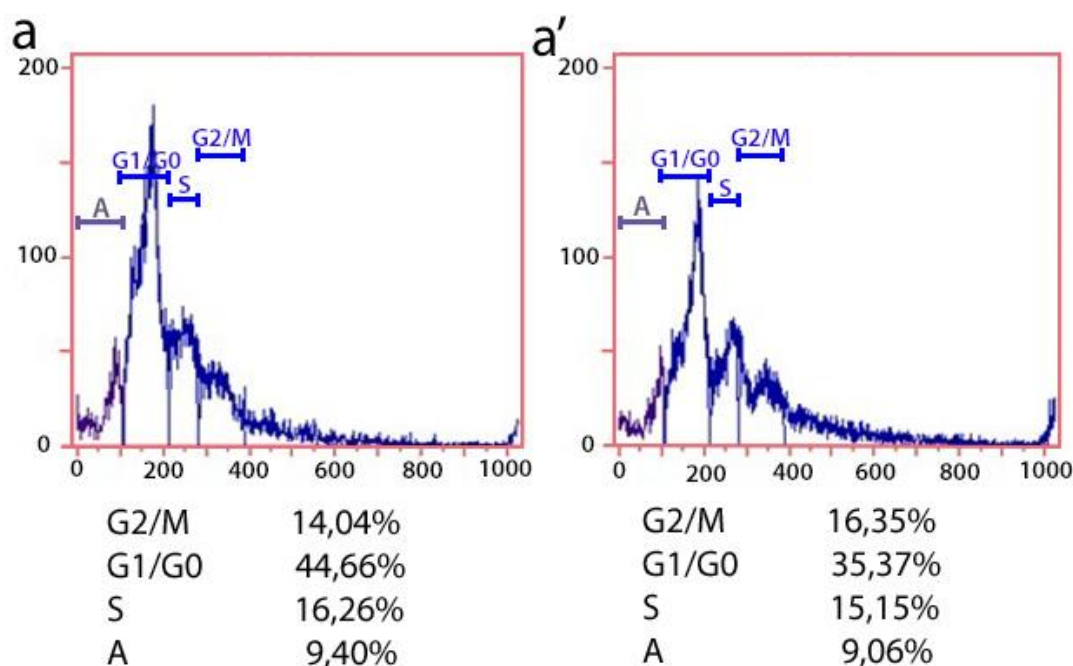


Рис.46. Включение PI *in vitro* первичными эмбриональными кератиноцитами.

а) C57Bl/6; а') *we/we wal/wal*; соотношение клеток в культуре на разных стадиях клеточного цикла в процентах. Проточная цитофлуориметрия.

М – митоз; S – синтез; А – апоптоз.

Сравнительный анализ данных проточной цитофлуориметрии показал, что процентное соотношение клеток в разных фазах клеточного цикла в культуре кератиноцитов *we/we wal/wal* практически не отличается от культуры клеток C57Bl/6 (рис. 46а, а').

Схожесть параметров клеточного цикла кератиноцитов *we/we wal/wal* по сравнению с C57Bl/6 в условиях *in vitro* может быть обусловлена отсутствием сигнальных факторов ниши, в частности, продуцируемых дермой и адаптацией клеток к условиям культивирования. Кинетическая структура популяции мутантных кератиноцитов *in vitro* не отличается от контроля.

III.7.4. Индукция дифференциации культуры первичных кератиноцитов

Отсутствие рогового слоя и увеличение числа пролиферирующих супрабазальных кератиноцитов может быть связано с нарушением способности кератиноцитов к своевременной клеточной дифференциации. Мы исследовали экспрессию маркеров дифференцированных кератиноцитов – кератина 1 (K1) и инволюкрин в ответ на индукцию дифференциации клеток в культуре.

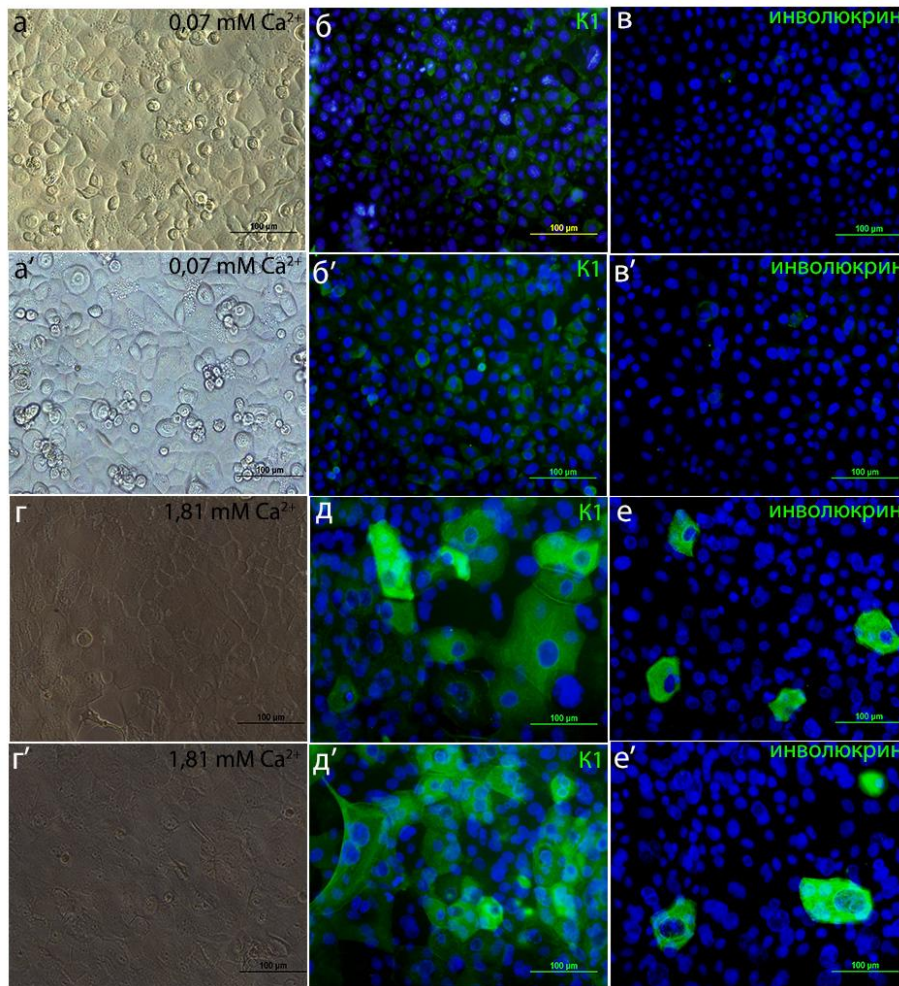
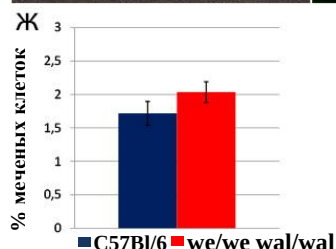


Рис.47. Дифференциация первичных кератиноцитов *in vitro*, полученных из эпидермиса на E18.5. а, б, в) 0,07мМ Ca^{2+} , C57Bl/6; а', б', в') 0,07мМ Ca^{2+} , we/we wal/wal; г, д, е) 1,81 мМ Ca^{2+} C57Bl/6; г', д', е') 1,81 мМ Ca^{2+} ; we/we wal/wal; а, а', г, г') световая микроскопия, фазовый контраст; б, б', д, д') иммуноцитохимия, флуоресцентная микроскопия, окраска антителами против кератина 1 (зеленый), ядра клеток докрашены DAPI (синий). Величина шкалы – 100 мкм.



в, в', е, е') иммуноцитохимия, флуоресцентная микроскопия, окраска антителами против инволюкрин (зеленый), ядра докрашены DAPI (синий).
ж) соотношение инволюкрин+ клеток в обеих культурах в процентах, статистически не значимое различие, $p=0,19$.

Известно, что среда с низким содержанием ионов кальция (0,05-0,1 мМ Ca^{2+}) способствует пролиферации кератиноцитов, отсутствию контактного ингибирования и длительному культивированию в течение месяцев (Hennings et al., 1980). В нашем эксперименте клетки на среде с низким содержанием ионов кальция 0,07 мМ Ca^{2+} имели полигональную

форму и формировали монослой, похожий на «булыжную мостовую» (рис. 47а, а'). Кератиноциты на низком кальции не стратифицировались, но продолжали синтезировать K1 на низком уровне, судя по слабому свечению после окраски антителами против K1 (рис. 47б, б'). Экспрессию инволюкрина в этих условиях практически не детектировали, за исключением редко встречающихся округлившихся инволюкрин⁺ клеток (рис. 47в, в'). Известно, что синтез инволюкрина некоторыми клетками при низком содержании ионов кальция свидетельствует о приобретении ими супрабазального положения (Watt, Green, 1981; Watt, 1983). В конечном итоге эти клетки спонтанно открепляются и слущиваются в культуральную среду, вероятно за счет активации депо внутриклеточного кальция, подобно кератиноцитам, культивируемым в суспензии (Li et al., 1996).

Эпидермальная дифференциация контролируется серией координированных морфологических и биохимических изменений, которые приводят к образованию высокоорганизованного, специализированного стратифицированного эпителия. В дифференцирующемся эпидермисе сначала экспрессируются ранние маркеры дифференциации: кератины 1 (K1) и 10 (K10), характерные для кератиноцитов шиповатого слоя, а затем поздние: филлагрин, инволюкрин, лорикрин и эпителиальные трансглутаминазы (Hennings et al., 1981; Thacher, Rice, 1985; Dotto, 1999; Candi et al., 2005). В литературе известно множество исследований, посвященных изучению механизмов регуляции дифференциации эпидермиса в условиях *in vitro*. Авторы, воздействуя различными агентами, такими как кальций, форболовый эфир (ТРА), витамин D3 и ретиноевая кислота, создают условия для дифференциации клеток, близкие к физиологическим (Dlugosz and Yuspa, 1993; Calautti et al., 1995; Bikle et al., 2001; Bikle et al., 2003; Bikle, 2004; Fisher et al., 1995; Yuspa et al., 1981; Yuspa et al., 1982; Lichti, Yuspa, 1988). Многие из этих веществ, вероятно, оказывают свое действие, модулируя транскрипционную активность генов. Одним из широко применяемых условий запуска дифференциации кератиноцитов является повышение концентрации внеклеточного Ca^{2+} в культуральной среде от 0,12 до 2 mM (Hennings et al., 1980). Однако, в разных исследованиях концентрация Ca^{2+} варьируется в широких пределах. В работе Yuspa (Yuspa et al., 1989) мышинные кератиноциты культивировали в среде с 0,05 mM Ca^{2+} , а терминальную дифференциацию индуцировали, повышая концентрацию до 1 mM Ca^{2+} . Однако, в среде с 1 mM Ca^{2+} обнаружили лишь малую фракцию клеток, экспрессирующих цитокератины 1/10, филлагрин и предшественники роговой оболочки. Повышая концентрацию Ca^{2+} постепенно, авторы показали, что экспрессия маркеров дифференциации на уровне мРНК и белка увеличивается при промежуточной концентрации 0,10-0,16 mM. При этом при низкой и высокой концентрациях экспрессия этих маркеров была либо слабой, либо не детектировалась. Таким образом, было показано, что оптимальная концентрация 0,10-0,16 mM Ca^{2+} необходима

не только для инициации, но и сохранения экспрессии маркеров дифференциации. Авторы предполагают, что такая промежуточная концентрация соответствует физиологическому градиенту Ca^{2+} *in vivo* (Yuspa et al., 1989).

Мы использовали заведомо высокую концентрацию ионов кальция и стимулировали дифференциацию кератиноцитов, повысив уровень с 0,07мМ Ca^{2+} до 1,81 мМ Ca^{2+} . Спустя 24 часа после смены среды с низким содержанием кальция на среду с высоким содержанием клетки образовали тесные межклеточные контакты, вероятно адгезионные и десмосомы (рис. 47г, г') (Hennings et al., 1980). При окраске антителами против K1 в культуре обнаружили обширные очаги ярко светящихся клеток (рис. 47д, д'). При этом были обнаружены единичные ярко светящиеся инволюкрин⁺ клетки (рис. 47е, е'). Наличие явной экспрессии K1 и инволюкрина свидетельствовало об активации дифференциации клеток. Однако, видимых отличий дифференциации кератиноцитов *we/we wal/wal* по сравнению с C57Bl/6 не наблюдали. Подсчет инволюкрин⁺ клеток в обеих культурах кератиноцитов показал отсутствие статистически значимого различия в темпах дифференциации между кератиноцитами E18.5 *we/we wal/wal* и C57Bl/6 в условиях *in vitro* (рис. 47ж). Таким образом, начальные этапы дифференциации мутантных кератиноцитов в условиях культуры не нарушены.

III.8. ОБРАЗОВАНИЕ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СТЕРЖНЯ ВОЛОСА У ЭМБРИОНОВ E18.5 МЫШЕЙ *WE/WE* *WAL/WAL*

Помимо дифференциации в ходе формирования полнослойного межфолликулярного эпидермиса, дифференцируются также фолликулярные кератиноциты. В ВФ после 4 стадии морфогенеза кератиноциты фолликула начинают формировать внутреннее корневое влагалище и клетки предшественники стержня волоса – прекортекс.

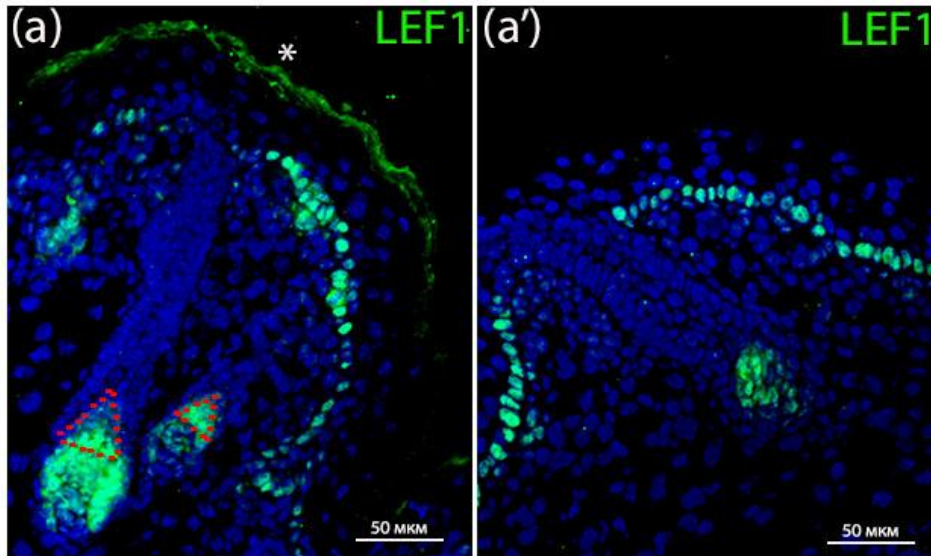


Рис.48. Экспрессия LEF1 в эмбриональной коже на E18.5. а) срез кожи C57Bl/6; а') срез кожи *we/we wal/wal*. Иммуногистохимия, флуоресцентная микроскопия, окраска антителами против LEF1 (зеленый), ядра докрашены DAPI (синий). Красным пунктиром выделен прекортекс; * – аутофлуоресценция рогового слоя.

При этом активируется сигнальный путь WNT. В клетках ДП, матриксе волоса и прекортексе обнаруживается экспрессия компонента этого пути – транскрипционного фактора LEF1 (Zhou et al., 1995; DasGupta, Fuchs, 1999; Liu et al., 2004).

Анализ экспрессии LEF1 в коже на E18.5 показал, что в контрольных ВФ клетки прекортекса экспрессируют LEF1 в структуре, образующей по форме треугольник (рис. 48а). В мутантных ВФ подобный треугольник отсутствовал (рис. 48а'). Следовательно, в эмбриональной коже *we/we wal/wal* помимо отсутствия ороговения межфолликулярного эпидермиса, нарушено формирование стержня ВФ на E18.5.

Задержка дифференциации и формирования прекортекса фолликулярными кератиноцитами еще в эмбриогенезе коррелирует с нарушением формирования стержня волоса после индукции стадии роста путем депиляции. Это связано с общими принципами эпителио-мезенхимных взаимодействий в морфогенезе ВФ. События взаимодействия дермального и эпидермального компонентов ВФ при образовании стержня волоса после первого его

формирования в эмбриогенезе повторяются при каждой стадии анагена цикла регенерации ВФ в течение жизни. И во время морфогенеза ВФ и во время анагена инициация образования стержня волоса происходит при взаимном обмене сигналами ДП с клетками матрикса волоса. Во время анагена транзиторно-амплифицирующиеся клетки матрикса волоса пролиферируют в ответ на сигналы из ДП, создавая клеточную массу для последующей дифференциации в множество структур волоса и внутреннего корневого влагалища. Правильный баланс обмена сигналами между ДП и матриксом позволяет матриксу волоса регулировать движение клеток, что впоследствии определяет размер волоса. Детерминация клеток матрикса происходит вскоре после их выхода из клеточного цикла и далее благодаря межклеточным взаимодействиям (Kopan, Weintraub, 1993). Регуляция этих процессов осуществляется с помощью сигнальных молекул FGF, BMP (Petiot et al., 2003; Kulesa et al., 2000; Ming Kwan et al., 2004), NOTCH (Favier et al., 2000; Lin et al., 2000; Blanpain et al., 2006; Vauclair et al., 2005; Estrach et al., 2006), FOXN1 (Prowse et al., 1999; Mecklenburg et al., 2001, 2005) и WNT (van Genderen et al., 1994; DasGupta, Fuchs, 1999; Millar et al., 1999).

Из литературных данных также известно, что в дифференциации фолликулярных кератиноцитов важную роль играют транскрипционные факторы FOXN1 (WHN, HFH 11), HOXC13, MSX2. Отсутствие FOXN1 приводит к неспособности формирования стержня волоса и тотальному облысению мышей (Mecklenburg et al., 2001, 2005). FOXN1 синтезируется в кератиноцитах внутреннего корневого влагалища и клетках прекортекса (Lee et al., 1999). Было показано, что FOXN1 является регулятором транскрипции генов кислых кератинов волос у мыши. Кислый кератин HA3 является мишенью FOXN1, экспрессируется исключительно в кортексе волоса и служит маркером дифференциации (Meier et al., 1999; Schorpp et al., 2000; Baxter, Brissette, 2002). HOXC13 экспрессируется в дифференцирующихся клетках будущего стержня волоса. У мышей *Hoxc13*^{-/-} ВФ формируются, но развиваются сильные нарушения структуры стержня волоса, что приводит к ломкости волос и облысению мышей (Godwin, Saracchi, 1998). MSX2 необходим для дифференциации стержня волоса. У мышей *Msx2*^{-/-} развивается циклическая алопеция. Авторы данного исследования показали зависимость экспрессии FOXN1 и HA3 от MSX2 (Ma et al., 2003).

Таким образом, успех формирования стержня волоса зависит от хода детерминации прогениторных клеток матрикса и реализации своевременных морфогенетических событий. У мышей *we/we* *wal/wal* этот процесс нарушен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженные в нашей работе многочисленные нарушения органогенеза кожи у лысеющих в постнатальном периоде мышей *we/we wal/wal* свидетельствует о том, что причины, ведущие к развитию этого наследственного заболевания, проявляются еще в период эмбриогенеза при закладке органа. В частности, процесс нарушения клеточной дифференциации, приводящий к деформации зрелых стержней волос, обнаруживается при формировании клеток-предшественников стержня волоса в эмбриональном эпидермисе. Нарушение дифференциации в эмбриональном развитии эпидермиса проявляется также в отсутствии своевременного ороговения. И хотя к моменту рождения шерстный покров мутантных животных выглядит почти нормально, в дальнейшем проявившиеся в эмбриогенезе дефекты развития кожи приводят к серьезным последствиям в виде облысения. Это связано с тем, что в постнатальном периоде ВФ в большой степени сохраняет и воспроизводит регуляторную сеть, сформированную еще в эмбриогенезе, что необходимо для полноценной регенерации в ходе повторяющихся циклов роста фолликулов. Исключение составляет процесс формирования клеток ДК и популяции эпидермальных фолликулярных СК в эмбриогенезе, которые впоследствии, будучи дефинитивной ДП и клетками БЖ, существуют на протяжении всей жизни организма. Мы обнаружили весьма интересные изменения в эмбриональной дерме мутантных животных. Во-первых, активность белков-маркеров дермального компонента зачатка фолликула проявлялась широко в папиллярной дерме, а не ограничивалась местом формирования фолликула. Во-вторых, можно было наблюдать агрегацию клеток дермы, положительных по белкам-маркерам ДК, в отсутствие видимых признаков фолликулогенеза в эпидермисе. Полученные результаты могут быть использованы для изучения так называемых «первичных сигналов», которые запускают процесс формирования придатков в коже и ограничивают сайты морфогенеза ВФ.

Множество исследований посвящено характеристике формирования придатков кожи, выяснению влияния и взаимодействия сигнальных молекул эпителио-мезенхимного взаимодействия, изменяющихся во времени и пространстве. Проведенное нами исследование вносит вклад в понимание органогенеза ВФ при патологии. Масштабы нарушения фолликулогенеза у мышей *we/we wal/wal* впечатляют. Отсутствие инвагинации и аномалии плакод ВФ у мышей *we/we wal/wal* могут быть следствием избытка синтеза ингибитора фолликулогенеза. При этом вполне вероятно, что этот ингибитор экспрессируется в самом эпидермисе, так как папиллярная дерма, синтезирующая молекулы характерные для ДК, в свою очередь индуцирует образование ВФ. Таким образом, наблюдается нарушение координации формирования эпидермальной и дермальной части в структуре ВФ.

Обнаружение нормального количества СК в мутантных фолликулах демонстрирует, что для нормального функционирования самообновляемой ткани важно не только наличие пула СК, но и реализация программы их выхода из ниши и последовательной дифференциации в функциональные клетки, которая у мутантов нарушена. Исследование культуры кератиноцитов, выделенных из мутантных эмбрионов показало отсутствие серьезных отклонений на начальной стадии дифференциации. Эти результаты могут быть учтены при разработке биомедицинских клеточных продуктов. Следует подчеркнуть, что в культуральных системах в основном используются условия, предотвращающие терминальную дифференциацию кератиноцитов. Поэтому при моделировании индукции ВФ *in vitro* следует иметь в виду, что комбинирования фолликулярных СК с ДП может быть недостаточно и следует обеспечить условия (нишу) для прохождения полноценной дифференциации эпидермальных клеток ВФ.

Без сомнения, дальнейшие исследования имеющихся в распоряжении мутантов с облысением должны быть сосредоточены на определении молекулярной природы мутаций. Эти данные в совокупности с проведенным нами подробным исследованием развития кожи и ВФ позволят существенно продвинуться в области дальнейшего изучения механизмов морфогенеза и регенерации этих органов. Вероятными кандидатами мутантного гена *we* являются гены трансглутаминаза 3 (*Tgm3*) и трансглутаминаза 6 (*Tgm6*). Возможными кандидатами мутантного гена *wal* могут быть гены молекул межклеточной адгезии – протокадгеринов, которые находятся в одном локусе сцепления с этим мутантным геном. Определение мутаций в генах *we* и *wal* и дальнейшее открытие белковых продуктов нормальных аллелей мутантных генов совместно с полученными нами данными расширит понимание не только механизмов органогенеза кожи и ВФ, причин развития алопеции, но и процесса клеточной дифференциации.

В данной работе помимо общепринятых в мировой науке методов характеристики «кожного фенотипа» у лабораторных животных были применены разработанные нами оригинальные методики. Мы полагаем, что подобный комплексный подход может быть использован специалистами для описания аномалий структуры кожи и волос у мышей с мутациями или у трансгенных животных, если имеются фенотипические проявления исследуемого гена в коже.

ВЫВОДЫ

1. У молодых мышей генотипа *we/we wal/wal* в сопоставлении с контролем C57Bl/6 в шерстном покрове обнаружены все 4 типа волос. Стержни волос мутантов сильно деформированы, и в них нарушено распределение пигмента. Волосные фолликулы (ВФ) зрелых особей *we/we wal/wal* содержат стволовые клетки.
2. Активация ВФ кожи спины мышей *we/we wal/wal* путем депиляции проходит успешно, но процесс дифференциации фолликулярных кератиноцитов нарушен. Волосы новой генерации дистрофичные и короткие.
3. Заживление кожной раны на спине зрелых особей *we/we wal/wal* соответствует нормальным темпам закрытия раневой поверхности.
4. У эмбрионов *we/we wal/wal* на E18.5 количество зачатков ВФ существенно меньше, чем в норме.
5. В эпидермисе эмбрионов *we/we wal/wal* на E18.5 обнаружены плакоды ВФ, в которых нарушена морфология клеток и инвагинация в дерму. Выявлены нарушения конденсации мезенхимных клеток – предшественников дермальной папиллы ВФ.
6. Обнаружена задержка дифференциации кератиноцитов эмбрионального мутантного эпидермиса и ВФ E18.5.
7. В культуре первичных эмбриональных кератиноцитов не выявлено статистически значимого различия в пролиферации и стратификации клеток *we/we wal/wal* по сравнению с контролем C57Bl/6.
8. Проведенная работа позволяет выдвинуть концепцию о проявлении признаков врожденной алопеции (облысения) уже при закладке кожи и ВФ в эмбриогенезе. Нарушение морфогенеза ВФ в раннем развитии коррелирует с неспособностью к физиологической и стимулированной регенерации во взрослом состоянии. Идентификация механизмов нарушений органогенеза ВФ позволит разрабатывать методы коррекции симптомов алопеции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Конюхов Б.В., Куприянов С.Д. Мутантный ген *wellhaarig* нарушает дифференцировку клеток волосяных фолликулов мыши // Онтогенез.–1990.–Т.21.–№1.–С.56–62.
2. Конюхов Б.В., Малинина Н.А., Мартынова М.Ю. Ген *we* – модификатор гена *wal* у мыши // Генетика.–2004.–Т.40.–№7.–С.968–974.
3. Нестерова А.П. Взаимодействие мутантных генов *Fgf5go-Y*, *hr*, *we* и *wal*, нарушающих развитие и рост волос у мыши: диссертация кандидата биологических наук: 03.02.07. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.–Москва 2010.–140 с.
4. Нестерова А.П., Низамутдинов И.И., Конюхов Б.В. Взаимодействие мутантных генов *Fgf5(go-Y)*, *we* и *wal* изменяет длительность циклов роста волос у мыши // Онтогенез.–2012.–Т.43.–№1.–С.60–65.
5. Риппа А.Л., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. Роль интегринов в формировании и гомеостазе эпидермиса и придатков кожи // Acta Naturae.–2013.–Т.4.–№19.–С.24-36.
6. Сорокина Ю.Д., Бландова З.К. Наследственное изменение кожного и шерстного покрова у мышей BALB/c-*wal*. Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных // Материалы Всесоюз. конф.–М.–1980.–С.79–80.
7. Терских В.В., Васильев А.В., Воротеляк Е.А. Поляризация и асимметричное деление стволовых клеток // Цитология.–2007.–Т.49.–№11.–С.933–938.
8. Чернова О.Ф. Архитектоника и диагностическое значение коры и сердцевины волос // Известия АН. Серия Биологическая.–2003.–№1.–С.63–73.
9. Adaimy L., Chouery E., Megarbane H., Mroueh S., Delague V., Nicolas E., Belguith H., de Mazancourt P., Megarbane A. Mutation in WNT10A is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho-dermal dysplasia // Am. J. Hum. Genet.–2007.–V.81.–№4–P.821–828.
10. Adams J.C., Watt F.M. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface // Cell.–1990.–V.63.–№2.–P.425–435.
11. Adams J.C., Watt F.M. Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes // J. Cell Biol.–1991.–V.115.–№3.–P.829–841.

12. Ali G., Chishti M.S., Raza S.I., John P., Ahmad W. A mutation in the lipase H (LIPH) gene underlie autosomal recessive hypotrichosis // *Hum. Genet.*–2007.–V.121.–P.319–325.
13. Alibardi L. Fine structure of marsupial hairs, with emphasis on trichohyalin and the structure of the inner root sheath // *J. Morphol.*–2004.–V.261.–№3.–P.390–402.
14. Ambler C.A., Watt F.M. Expression of Notch pathway genes in mammalian epidermis and modulation by beta-catenin // *Dev. Dyn.*–2007.–V.236.–№6.–P.1595–1601.
15. Andl T., Ahn K., Kairo A., Chu E.Y., Wine-Lee L., Reddy S.T., Croft N.J., Cebra-Thomas J.A., Metzger D., Chambon P., Lyons K.M., Mishina Y., Seykora J.T., Crenshaw E.B. 3rd, Millar S.E. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development // *Development.*–2004.–V.131.–№10.–P.2257–2268.
16. Andl T., Reddy S.T., Gaddapara T., Millar S.E. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development // *Dev. Cell.*–2002.–V.2.–№5.–P.643–653.
17. Aumailley M., Bruckner-Tuderman L., Carter W.G., Deutzmann R., Edgar D., Ekblom P., Engel J., Engvall E., Hohenester E., Jones J.C., Kleinman H.K., Marinkovich M.P., Martin G.R., Mayer U., Meneguzzi G., Miner J.H., Miyazaki K., Patarroyo M., Paulsson M., Quaranta V., Sanes J.R., Sasaki T., Sekiguchi K., Sorokin L.M., Talts J.F., Tryggvason K., Uitto J., Virtanen I., von der Mark K., Wewer U.M., Yamada Y., Yurchenco P.D. A simplified laminin nomenclature // *Matrix. Biol.*–2005.–V.24.–№5.–P.326–332.
18. Axelrod J.D. Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling // *Semin. Cell. Dev. Biol.*–2009.–V.20.–№8.–P.964–971.
19. Ayub M., Basit S., Jelani M., Ur Rehman F., Iqbal M., Yasinzai M., Ahmad W. A homozygous nonsense mutation in the human desmocollin-3 (DSC3) gene underlies hereditary hypotrichosis and recurrent skin vesicles // *Am. J. Hum. Genet.*–2009.–V.85.–№4.–P.515–520.
20. Baek I.C., Kim J.K., Cho K.H., Cha D.S., Cho J.W., Park J.K., Song C.W., Yoon S.K. A novel mutation in Hr causes abnormal hair follicle morphogenesis in hairpoor mouse, an animal model for Marie Unna hereditary hypotrichosis // *Mamm. Genome.*–2009.–V.20.–№6.–P.350–358.
21. Bal E., Baala L., Cluzeau C., ElKerch F., Ouldim K., Hadj-Rabia S., Bodemer C., Munnich A., Courtois G., Sefiani A., Smahi A. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the EDARADD locus // *Hum. Mutat.* – 2007. – V.28. – №7. – P.703–709.
22. Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. Integrins // *Cell Tissue Res.*–2010.–V.339.–№1.–P.269–280.
23. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing // *Wound Repair Regen.*–2008.–V.16.–№5.–P.585–601.
24. Baxter R.M., Brissette J.L. Role of the nude gene in epithelial terminal differentiation // *J. Invest. Dermatol.*–2002.–V.118.–№2.–P.303–309.

25. Bayes M., Hartung A.J., Ezer S., Pispá J., Thesleff I., Srivastava A.K., Kere J. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats // *Hum. Mol. Genet.*—1998.—V.7.—№11.—P.1661–1669.
26. Bazzi H., Demehri S., Potter C.S., Barber A.G., Awgulewitsch A., Kopan R., Christiano A.M. Desmoglein 4 is regulated by transcription factors implicated in hair shaft differentiation // *Differentiation*.—2009.—V.78.—№5.—P.292–300.
27. Bazzi H., Getz A., Mahoney M.G., Ishida-Yamamoto A., Langbein L., Wahl J.K. 3rd, Christiano A.M. Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle // *Differentiation*.—2006.—V.74.—№2.—P.129–140.
28. Benavides F., Starost M.F., Flores M., Gimenez-Conti I.B., Guénet J.L., Conti C.J. Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in naked mice, a cathepsin L-deficient mutation // *Am. J. Pathol.*—2002.—V.161.—№2.—P.693–703.
29. Bennett V., Healy J. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin // *Trends Mol. Med.*—2008.—V.14.—№1.—P.28–36.
30. Bergman R., Sprecher E. Histopathological and ultrastructural study of ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome // *Am. J. Dermatopathol.*—2005.—V.27.—№4.—P.333–338.
31. Beverdam A., Claxton C., Zhang X., James G., Harvey K.F., Key B. Yap controls stem/progenitor cell proliferation in the mouse postnatal epidermis // *J. Invest. Dermatol.*—2013.—V.133.—№6.—P.1497–1505.
32. Bierkamp C., McLaughlin K.J., Schwarz H., Huber O., Kemler R. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin // *Dev. Biol.*—1996.—V.180.—№2.—P.780–785.
33. Bikle D.D., Ng D., Tu C.L., Oda Y., Xie Z. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation // *Mol. Cell Endocrinol.*—2001.—V.177.—№1.—P.161–171.
34. Bikle D.D., Tu C.L., Xie Z., Oda Y. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation: role of coactivators // *J. Cell Biochem.*—2003.—V.88.—№2.—P.290–295.
35. Bikle D.D. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation // *J. Cell Biochem.*—2004.—V.92.—№3.—P.436–444.
36. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*—2009.—V.10.—№3.—P.207–217.
37. Blanpain C., Fuchs E. p63: revving up epithelial stem-cell potential // *Nat. Cell Biol.*—2007.—V.9.—№7.—P.731–733.
38. Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A., Polak L., Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche // *Cell*.—2004.—V.118.—№5.—P.635–648.

39. Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage // *Genes Dev.*–2006.–V.20.–№21.–P.3022–3035.
40. Blume-Peytavi U., Tosti A., Whiting D.A., Trueb R.M. Hair growth and disorders // Springer Berlin Heidelberg.–2008.–P.590.
41. Botchkarev V.A., Botchkareva N.V., Roth W., Nakamura N., Chen L.H., Herzog W., Lindner G., McMahon J.A., Peters C., Lauster R., McMahon A.P., Paus R. Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction // *Nat. Cell Biol.*–1999.–V.1.–№3.–P.158–164.
42. Botchkarev V.A., Botchkareva N.V., Sharov A.A., Funa K., Huber O., Gilchrist B.A. Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles // *J. Invest. Dermatol.*–2002.–V.118.–№1.–P.3–10.
43. Botchkarev V.A., Gdula M.R., Mardaryev A.N., Sharov A.A., Fessing M.Y. Epigenetic regulation of gene expression in keratinocytes // *J. Invest. Dermatol.*–2012.–V.132.–№11.–P.2505–2521.
44. Botchkareva N.V., Botchkarev V.A., Chen L.H., Lindner G., Paus R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of hair follicle morphogenesis // *Dev. Biol.*–1999.–V.216.–№1.–P.135–153.
45. Brakebusch C., Grose R., Quondamatteo F., Ramirez A., Jorcano J.L., Pirro A., Svensson M., Herken R., Sasaki T., Timpl R. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes // *EMBO J.*–2000.–V.19.–№15.–P.3990–4003.
46. Braun K.M., Niemann C., Jensen U.B., Sundberg J.P., Silva-Vargas V., Watt F.M. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis // *Development.*–2003.–V.130.–№21.–P.5241–5255.
47. Braun K.M., Watt F.M. Epidermal label-retaining cells: background and recent applications // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*–2004.–V.9.–№3.–P.196–201.
48. Breitkreutz D., Mirancea N., Nischt R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? // *Histochem. Cell. Biol.*–2009.–V.132.–№1.–P.1–10.
49. Brooke H.C. Hairless mice // *J. Hered.*–1926.–V.17.–P.173–174.
50. Brownell I., Guevara E., Bai C.B., Loomis C.A., Joyner A.L. Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells // *Cell Stem Cell.*–2011.–V.8.–№5.–P.552–565.
51. Bryant D.M., Mostov K.E. From cells to organs: building polarized tissue // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*–2008.–V.9.–№11.–P.887–901.
52. Byrne C., Tainsky M., Fuchs E., Programming gene expression in developing epidermis // *Development.*–1994.–V.120.–№9.–P.2369–2383.

53. Calautti E., Missero C., Stein P.L., Ezzell R.M., Dotto G.P. *fyn* tyrosine kinase is involved in keratinocyte differentiation control // *Genes Dev.*—1995.—V.9.—№18.—P.2279–2291.
54. Candi E., Melino G., Mei G., Tarcsa E., Chung S.I., Marekov L.N., Steinert P.M. Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein // *J. Biol. Chem.*—1995.—V.270.—№44.—P.26382–26390.
55. Candi E., Schmidt R., Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*—2005.—V.6.—№4.—P.328–340.
56. Carroll J.M., Romero M.R., Watt F.M. Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis // *Cell.*—1995.—V.83.—№6.—P.957–968.
57. Celli J., Duijf P., Hamel B., Bamshad M., Kramer B., Smits A.P., Newbury-Ecob R., Hennekam R.C., Van Buggenhout G., van Haeringen A., Woods C.G., van Essen A.J., de Waal R., Vriend G., Haber D.A., Yang A., McKeon F., Brunner H.G., van Bokhoven H. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome // *Cell.*—1999.—V.99.—№2.—P.143–153.
58. Cereijido M., Valdés J., Shoshani L., Contreras R.G. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity // *Annu. Rev. Physiol.*—1998.—V.60.—P.161–177.
59. Chen C.C., Chuong C.M. Multi-layered environmental regulation on the homeostasis of stem cells: the saga of hair growth and alopecia // *J. Dermatol. Sci.*—2012.—V.66.—№1.—P.3–11.
60. Chen J., Chuong C.M. Patterning skin by planar cell polarity: the multi-talented hair designer // *Exp. Dermatol.*—2012.—V.21.—№2.—P.81–85.
61. Chi W., Wu E., Morgan B.A. Dermal papilla cell number specifies hair size, shape and cycling and its reduction causes follicular decline // *Development.*—2013.—V.140.—№8.—P.1676–1683.
62. Chiang C., Swan R.Z., Grachtchouk M., Bolinger M., Litingtung Y., Robertson E.K., Cooper M.K., Gaffield W., Westphal H., Beachy P.A., Dlugosz A.A. Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis // *Dev. Biol.*—1999.—V.205.—№1.—P.1–9.
63. Clayton E., Doupe D.P., Klein A.M., Winton D.J., Simons B.D., Jones P.H. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis // *Nature.*—2007.—V.446.—№7132.—P.185–189.
64. Colognato H., Yurchenco P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers // *Dev. Dyn.*—2000.—V.218.—№2.—P.213–234.
65. Conti F.J., Rudling R.J., Robson A., Hodivala-Dilke K.M. $\alpha 3\beta 1$ -integrin regulates hair follicle but not interfollicular morphogenesis in adult epidermis // *J. Cell Sci.*—2003.—V.116.—P.2737–2747.

66. Cotsarelis G., Sun T.T., Lavker R.M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis // *Cell*.–1990.–V.61.–№7.–P.1329–1337.
67. Croyle M.J., Lehman J.M., O'Connor A.K., Wong S.Y., Malarkey E.B., Iribarne D., Dowdle W.E., Schoeb T.R., Verney Z.M., Athar M., Michaud E.J., Reiter J.F., Yoder B.K. Role of epidermal primary cilia in the homeostasis of skin and hair follicles // *Development*.–2011.–V.138.–№9.–P.1675–1685.
68. Cui C.Y., Durmowicz M., Ottolenghi C., Hashimoto T., Griggs B., Srivastava A.K., Schlessinger D. Inducible mEDA-A1 transgene mediates sebaceous gland hyperplasia and differential formation of two types of mouse hair follicles // *Hum. Mol. Genet*.–2003.–V.12.–№22.–P.2931–2940.
69. Cui C.Y., Kunisada M., Piao Y., Childress V., Ko M.S., Schlessinger D. Dkk4 and Eda regulate distinctive developmental mechanisms for subtypes of mouse hair // *PLoS One*.–2010.–V.5.–№4.–e10009.
70. DasGupta R., Fuchs E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation // *Development*.–1999.–V.126.–№1.–P.4557–4568.
71. Demehri S., Kopan R. Notch signaling in bulge stem cells is not required for selection of hair follicle fate // *Development*.–2009.–V.136.–№6.–P.891–896.
72. DeRouen M.C., Zhen H., Tan S.H., Williams S., Marinkovich M.P., Oro A.E. Laminin-511 and integrin beta-1 in hair follicle development and basal cell carcinoma formation // *BMC Dev. Biol*.–2010.–V.10.–P.112.
73. Devenport D., Fuchs E. Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles // *Nat. Cell. Biol*.–2008.–V.10.–№11.–P.1257–1268.
74. Dhouailly D. Dermo-epidermal interactions between birds and mammals: differentiation of cutaneous appendages // *J. Embryol. Exp. Morph*.–1973.–V.30.–P.1–18.
75. DiPersio C.M., Hodivala-Dilke K.M., Jaenisch R., Kreidberg J.A., Hynes R.O. alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane // *J. Cell Biol*.–1997.–V.137.–№3.–P.729–742.
76. DiPersio C.M., van der Neut R., Georges-Labouesse E., Kreidberg J.A., Sonnenberg A., Hynes R.O. alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin receptors for laminin-5 are not essential for epidermal morphogenesis and homeostasis during skin development // *J. Cell Sci*.–2000.–V.113.–P.3051–3062.

77. Dlugosz A.A., Yuspa S.H. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C // *J. Cell Biol.*–1993.–V.120.–№1.–P.217–225.
78. Donovan J. Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma // *Dermatol. Surg.*–2009.–V.35.–№9.–P.1311–1323.
79. Dotto G.P. Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*–1999.–V.10.–№4.–P.442–457.
80. Dowling J., Yu Q.C., Fuchs E. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival // *J. Cell Biol.*–1996.–V.134.–№2.–P.559–572.
81. Driskell R.R., Giangreco A., Jensen K.B., Mulder K.W., Watt F.M. Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis // *Development.*–2009.–V.136.–№16.–P.2815–2823.
82. Durbeek M. Laminins // *Cell Tissue Res.*–2010.–V.339.–№1.–P.259–268.
83. Duverger O., Morasso M.I. Epidermal patterning and induction of different hair types during mouse embryonic development // *Birth Defects Res. C. Embryo Today.*–2009.–V.87.–№3.–P.263–272.
84. Eckert R.L., Adhikary G., Balasubramanian S., Rorke E.A., Vemuri M.C., Boucher S.E., Bickenbach J.R., Kerr C. Biochemistry of epidermal stem cells // *Biochim. Biophys. Acta.*–2013.–V.1830.–№2.–P.2427–2434.
85. El Ghalbzouri A., Jonkman M.F., Dijkman R., Ponc M. Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes // *J. Invest. Dermatol.*–2005.–V.124.–№1.–P.79–86.
86. Ellis T., Gambardella L., Horcher M., Tschanz S., Capol J., Bertram P., Jochum W., Barrandon Y., Busslinger M. The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle // *Genes Dev.*–2001.–V.15.–№17.–P.2307–2319.
87. Ellis T., Smyth I., Riley E., Bowles J., Adolphe C., Rothnagel J.A., Wicking C., Wainwright B.J. Overexpression of Sonic Hedgehog suppresses embryonic hair follicle morphogenesis // *Dev. Biol.*–2003.–V.263.–№2.–P.203–215.
88. Enshell-Seijffers D., Lindon C., Morgan B.A. The serine protease Corin is a novel modifier of the Agouti pathway // *Development.*–2008.–V.135.–№2.–P.217–225.
89. Estrach S., Ambler C.A., Lo Celso C., Hozumi K., Watt F.M. Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis // *Development.*–2006.–V.133.–№ 22.–P.4427–4438.

90. Estrach S., Cordes R., Hozumi K., Gossler A., Watt F.M. Role of the Notch ligand Delta1 in embryonic and adult mouse epidermis // *J. Invest. Dermatol.*—2008.—V.128.—№4.—P.825–832.
91. Ezhkova E., Lien W.H., Stokes N., Pasolli H.A., Silva J.M., Fuchs E. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair // *Genes Dev.*—2011.—V.25.—№5.—P.485–498.
92. Fassler R., Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice // *Genes Dev.*—1995.—V.9.—P.1896–1908.
93. Favier B., Fliniaux I., Thélu J., Viallet J.P., Demarchez M., Jahoda C.A., Dhouailly D. Localisation of members of the notch system and the differentiation of vibrissa hair follicles: receptors, ligands, and fringe modulators // *Dev. Dyn.*—2000.—V.218.—№3.—P.426–437.
94. Ferguson B.M., Brockdorff N., Formstone E., Ngyuen T., Kronmiller J.E., Zonana J. Cloning of Tabby, the murine homolog of the human EDA gene: evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain // *Hum. Mol. Genet.*—1997.—V.6.—№9.—P.1589–1594.
95. Fisher C., Blumenberg M., Tomić-Canić M. Retinoid receptors and keratinocytes // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*—1995.—V6.—№4.—P.284–301.
96. Fleischmajer R., Schechter A., Bruns M., Perlish J.S., Macdonald E.D., Pan T.C., Timpl R., Chu M.L. Skin fibroblasts are the only source of nidogen during early basal lamina formation in vitro // *J. Invest. Dermatol.*—1995.—V.105.—№4.—P.597–601.
97. Fliniaux I., Mikkola M.L., Lefebvre S., Thesleff I. Identification of dkk4 as a target of Eda-A1/Edar pathway reveals an unexpected role of ectodysplasin as inhibitor of Wnt signalling in ectodermal placodes // *Dev. Biol.*—2008.—V.320.—№1.—P.60–71.
98. Foitzik K., Paus R., Doetschman T., Dotto G.P. The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis // *Dev. Biol.*—1999.—V.212.—№2.—P.278–289.
99. Folgueras A.R., Guo X., Pasolli H.A., Stokes N., Polak L., Zheng D., Fuchs E. Architectural niche organization by LHX2 is linked to hair follicle stem cell function // *Cell Stem Cell.*—2013.—V.13.—№3.—P.314–327.
100. Frances D., Niemann C. Stem cell dynamics in sebaceous gland morphogenesis in mouse skin // *Dev. Biol.*—2012.—V.363.—№1.—P.138–146.
101. Frank J., Pignata C., Panteleyev A.A., Prowse D.M., Baden H., Weiner L., Gaetaniello L., Ahmad W., Pozzi N., Cserhalmi-Friedman P.B., Aita V.M., Uyttendaele H., Gordon D., Ott J., Brissette J.L., Christiano A.M. Exposing the human nude phenotype // *Nature.*—1999.—V. 398.—№6727.—P.473–474.

102. Fu J., Hsu W. Epidermal Wnt controls hair follicle induction by orchestrating dynamic signaling crosstalk between the epidermis and dermis // *J. Invest. Dermatol.*–2013.–V.133.–№4.–P.890–898.
103. Fuchs E., Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis // *Nat. Rev. Genet.*–2002.–V.3.–№3.–P.199–209.
104. Fuchs E., Tumber T., Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche // *Cell.*–2004.–V.116.–№6.–P.769–778.
105. Fuchs E., Nowak J.A. Building epithelial tissues from skin stem cells // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*–2008.–V.73.–P.333–350.
106. Fuchs E. Scratching the surface of skin development // *Nature.*–2007.–V.445.–№7130.–P.834–842.
107. Fujimoto A., Farooq M., Fujikawa H., Inoue A., Ohyama M., Ehama R., Nakanishi J., Hagihara M., Iwabuchi T., Aoki J., Ito M., Shimomura Y. A missense mutation within the helix initiation motif of the keratin K71 gene underlies autosomal dominant woolly hair/hypotrichosis // *J. Invest. Dermatol.*–2012.–V.132.–№10.–P.2342–2349.
108. Fukui M., Kuramoto K., Yamasaki R., Shimizu Y., Ito M., Kawamoto T., Hitomi K. Identification of a highly reactive substrate peptide for transglutaminase 6 and its use in detecting transglutaminase activity in the skin epidermis // *FEBS J.*–2013.–V.280.–№6.–P.1420–1429.
109. Gallicano G.I., Kouklis P., Bauer C., Yin M., Vasioukhin V., Degenstein L., Fuchs E. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage // *J. Cell Biol.*–1998.–V.143.–№7.–P.2009–2022.
110. Gao J., DeRouen M.C., Chen C.H., Nguyen M., Nguyen N.T., Ido H., Harada K., Sekiguchi K., Morgan B.A., Miner J.H., Oro A.E., Marinkovich M.P. Laminin-511 is an epithelial message promoting dermal papilla development and function during early hair morphogenesis // *Genes Dev.*–2008.–V.22.–№15.–P.2111–2124.
111. Garza L.A., Yang C.C., Zhao T., Blatt H.B., Lee M., He H., Stanton D.C., Carrasco L., Spiegel J.H., Tobias J.W., Cotsarelis G. Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells // *J. Clin. Invest.*–2011.–V.121.–№2.–P.613–622.
112. Georges-Labouesse E., Messaddeq N., Yehia G., Cadalbert L., Dierich A., LeMeur M. Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice // *Nat. Genet.*–1996.–V.13.–№3.–P.370–373.
113. Godwin A.R., Capecchi M.R. Hoxc13 mutant mice lack external hair // *Genes Dev.*–1998.–V.12.–№1.–P.11–20.

114. Gray J., Dawber R. A Pocketbook of hair and scalp disorders: an illustrated guide. // Blackwell Science.–1999.–ISBN: 978-0-632-05189-2.
115. Grose R., Hutter C., Bloch W., Thorey I., Watt F.M., Fässler R., Brakebusch C., Werner S. A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair // *Development*.–2002.–V.129.–№9.–P.2303–2315.
116. Gubb D., Garcia-Bellido A. A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster* // *J. Embryol. Exp. Morphol.*–1982.–V.68.–P.37–57.
117. Hammond N.L., Headon D.J., Dixon M.J. The cell cycle regulator protein 14-3-3 σ is essential for hair follicle integrity and epidermal homeostasis // *J. Invest. Dermatol.*–2012.–V.132.–№6.–P.1543–1553.
118. Handjiski B.K., Eichmüller S., Hofmann U., Czarnecki B.M., Paus R. Alkaline phosphatase activity and localization during the murine hair cycle // *Br. J. Dermatol.*–1994.–V.131.–№3.–P.303–310.
119. Hansen L.A., Alexander N., Hogan M.E., Sundberg J.P., Dlugosz A., Threadgill D.W., Magnuson T., Yuspa S.H. Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development // *Am. J. Pathol.*–1997.–V.150.–№6.–P.1959–1975.
120. Hardy M.H. The secret life of the hair follicle // *Trends Genet.* 1992. V.8. P.55–61
121. Hashmi S., Marinkovich M.P. Molecular organization of the basement membrane zone // *Clin. Dermatol.*–2011.–V.29.–№4.–P.398–411.
122. Headon D.J., Emmal S.A., Ferguson B.M., Tucker A.S., Justice M.J., Sharpe P.T., Zonana J., Overbeek P.A. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development // *Nature*.–2001.–V.414.–№6866.–P.913–916.
123. Headon D.J., Overbeek P.A. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction // *Nat. Genet.*–1999.–V.22.–№4.–P.370–374.
124. Hébert J.M., Rosenquist T., Gotz J., Martin G.R. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations // *Cell*.–1994.–V.78.–P.1017–1025.
125. Hennings H., Michael D., Cheng C., Steinert P., Holbrook K., Yuspa S.H. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture // *Cell*.–1980.–V.19.–№1.–P.245–254.
126. Hennings H., Steinert P., Buxman M.M. Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon(gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–1981.–V.102.–№2.–P.739–745.

127. Hertle M., Adams J., Watt F.M. Integrin expression during human epidermal development in vivo and in vitro // *Development*.–1991.–V.112.–№1.–P.193–206.
128. Hertwig P. Neue Mutationen und Koppelungsgruppen bei der Hausmaus // *Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungsl.*–1942.–V.80.–P.220–246.
129. Hillmer A.M., Flaquer A., Hanneken S., Eigelshoven S., Kortüm A.K., Brockschmidt F.F., Golla A., Metzen C., Thiele H., Kolberg S., Reinartz R., Betz R.C., Ruzicka T., Hennies H.C., Kruse R., Nöthen M.M. Genome-wide scan and fine-mapping linkage study of androgenetic alopecia reveals a locus on chromosome 3q26 // *J. Hum. Genet.*–2008.–V.3.–P.737–743.
130. Hillmer A.M., Hanneken S., Ritzmann S., Becker T., Freudenberg J., Brockschmidt F.F., Flaquer A., Freudenberg-Hua Y., Jamra R.A., Metzen C., Heyn U., Schweiger N., Betz R.C., Blaumeiser B., Hampe J., Schreiber S., Schulze T.G., Hennies H.C., Schumacher J., Propping P., Ruzicka T., Cichon S., Wienker T.F., Kruse R., Nothen M.M. Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia // *Am. J. Hum. Genet.*–2005.–V.77.–№1.–P.140–148.
131. Hippe-Sanwald S. Impact of freeze substitution on biological electron microscopy // *Microsc. Res. Tech.*–1993.–V.24.–№5.–P.400–422.
132. Hirai Y., Nose A., Kobayashi S., Takeichi M. Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis // *Development*.–1989.–V.105.–№2.–P.271–277.
133. Hitomi K., Horio Y., Ikura K., Yamanishi K., Maki M. Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) expression in mouse tissues and cell lines // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*–2001.–V.33.–№5.–P.491–498.
134. Horsley V., Aliprantis A.O., Polak L., Glimcher L.H., Fuchs E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells // *Cell*.–2008.–V.132.–P.299–310.
135. Horsley V., O'Carroll D., Tooze R., Ohinata Y., Saitou M., Obukhanych T., Nussenzweig M., Tarakhovsky A., Fuchs E. Blimp1 defines a progenitor population that governs cellular input to the sebaceous gland // *Cell*.–2006.–V.126.–№3.–P.597–609.
136. Hotchin N.A., Gandarillas A., Watt F.M. Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation // *J. Cell Biol.*–1995.–V.128.–№6.–P.1209–1219.
137. Hsu Y.C., Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis // *Nat Rev Mol Cell Biol.*–2012.–V.13.–№2.–P.103–114.
138. Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., Cotsarelis G., Birchmeier W. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin // *Cell*.–2001.–V.105.–№4.–P.533–545.

139. Huh S.H., Närhi K., Lindfors P.H., Häärä O., Yang L., Ornitz D.M., Mikkola M.L. Fgf20 governs formation of primary and secondary dermal condensations in developing hair follicles // *Genes Dev.*—2013.—V.27.—№4.—P.450–458.
140. Iida M., Ihara S., Matsuzaki T. Hair cycle-dependent changes of alkaline phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissal follicles // *Dev. Growth Differ.*—2007.—V.49.—№3.—P.185–195.
141. Inamatsu M., Tochio T., Makabe A., Endo T., Oomizu S., Kobayashi E., Yoshizato K. Embryonic dermal condensation and adult dermal papilla induce hair follicles in adult glabrous epidermis through different mechanisms // *Dev. Growth Differ.*—2006.—V.48.—№2.—P.73–86.
142. Irvine A.D., Christiano A.M. Hair on a gene string: recent advances in understanding the molecular genetics of hair loss // *Clin. Exp. Dermatol.*—2001.—V.26.—№1.—P.59–71.
143. Iseki S., Araga A., Ohuchi H., Nohno T., Yoshioka H., Hayashi F., Noji S. Sonic hedgehog is expressed in epithelial cells during development of whisker, hair, and tooth // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—1996.—V.218.—№3.—P.688–693.
144. Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S.E., Cotsarelis G. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding// *Nature.*—2007.—V.447.—№7142.—P.316–320.
145. Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R.J., Cotsarelis G. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis // *Nat Medicine.*—2005.—V.11.—P.1351–1354.
146. Ito Y., Hamazaki T.S., Ohnuma K., Tamaki K., Asashima M., Okochi H. Isolation of murine hair-inducing cells using the cell surface marker prominin-1/CD133 // *J. Invest. Dermatol.*—2007.—V.127.—P.1052–1060.
147. Jahoda C.A., Horne K.A., Oliver R.F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells // *Nature.*—1984.—V.311.—P.560–562.
148. Jaks V., Barker N., Kasper M., van Es J.H., Snippert H.J., Clevers H., Toftgard R. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells // *Nat. Genet.*—2008.—V.40.—№11.—P.1291–1299.
149. Jensen U.B., Lowell S., Watt F.M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis // *Development.*—1999.—V.126.—№11.—P.2409–2418.
150. John S., Thiebach L., Frie C., Mokkapati S., Bechtel M., Nischt R., Rosser-Davies S., Paulsson M., Smyth N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier // *PLoS One.*—2012.—V.7.—№4.—e34252.

151. Kandyba E., Leung Y., Chen Y.B., Widelitz R., Chuong C.M., Kobiela K. Competitive balance of intrabulge BMP/Wnt signaling reveals a robust gene network ruling stem cell homeostasis and cyclic activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–2013.–V.110.–№4.–P.1351–1356.
152. Kaplan E.D., Holbrook K.A. Dynamic expression patterns of tenascin, proteoglycans, and cell adhesion molecules during human hair follicle morphogenesis // *Dev. Dyn.*–1994.–V.199.–№2.–P.141–155.
153. Karlsson L., Bondjers C., Betsholtz C. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle // *Development.*–1999.–V.126.–№12.–P.2611–2621.
154. Kaufman C.K., Zhou P., Pasolli H.A., Rendl M., Bolotin D., Lim K.C., Dai X., Alegre M.L., Fuchs E. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin // *Genes Dev.*–2003.–V.17.–№17.–P.2108–2122.
155. Kazantseva A., Goltsov A., Zinchenko R., Grigorenko A.P., Abrukova A.V., Moliaka Y.K., Kirillov A.G., Guo Z., Lyle S., Ginter E.K., Rogaev E.I. Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH // *Science.*–2006.–V.314.–№5801.–P.982–985.
156. Keene D.R., Marinkovich M.P., Sakai L.Y. Immunodissection of the connective tissue matrix in human skin // *Microsc. Res. Tech.*–1997.–V.38.–№4.–P.394–406.
157. Kere J., Srivastava A.K., Montonen O., Zonana J., Thomas N., Ferguson B., Munoz F., Morgan D., Clarke A., Baybayan P., Chen E.Y., Ezer S., Saarialho-Kere U., de la Chapelle A., Schlessinger D. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein // *Nat. Genet.*–1996.–V.13.–№4.–P.409–416.
158. Kikkawa Y., Oyama A., Ishii R., Miura I., Amano T., Ishii Y., Yoshikawa Y., Masuya H., Wakana S., Shiroishi T., Taya C., Yonekawa H. A small deletion hotspot in the type II keratin gene mK6irs1/Krt2–6g on mouse chromosome 15, a candidate for causing the wavy hair of the caracul (Ca) mutation // *Genetics.*–2003.–V.165.–№2.–P.721–733.
159. Kikkawa Y., Sanzen N., Fujiwara H., Sonnenberg A., Sekiguchi K. Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins // *J. Cell Sci.*–2000.–V.113.–P.869–876.
160. Kim J.K., Kim E., Baek I.C., Kim B.K., Cho A.R., Kim T.Y., Song C.W., Seong J.K., Yoon J.B., Stenn K.S., Parimoo S., Yoon S.K. Overexpression of Hr links excessive induction of Wnt signaling to Marie Unna hereditary hypotrichosis // *Hum. Mol. Genet.*–2010.–V.19.–№3.–P.445–453.

161. Kishimoto J., Ehama R., Wu L., Jiang S., Jiang N., Burgeson R.E. Selective activation of the versican promoter by epithelial–mesenchymal interactions during hair follicle development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–1999.–V.96.–№13.–P.7336–7341.
162. Kiso M., Tanaka S., Saba R., Matsuda S., Shimizu A., Ohyama M., Okano H.J., Shiroishi T., Okano H., Saga Y. The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–2009.–V.106.–№23.–P.9292–9297.
163. Kivirikko S., McGrath J.A., Baudoin C., Aberdam D., Ciatti S., Dunnill M.G., McMillan J.R., Eady R.A., Ortonne J.P., Meneguzzi G., Uitto J., Christiano A.M. A homozygous nonsense mutation in the alpha 3 chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epidermolysis bullosa // *Hum. Mol. Genet.*–1995.–V.4.–№5.–P.959–962.
164. Kjaer K.W., Hansen L., Schwabe G.C., Marques-de-Faria A.P., Eiberg H., Mundlos S., Tommerup N., Rosenberg T. Distinct CDH3 mutations cause ectodermal dysplasia, ectrodactyly, macular dystrophy (EEM syndrome) // *J. Med. Genet.*–2005.–V.42.–№4.–P.292–298.
165. Kljuic A., Bazzi H., Sundberg J.P., Martinez-Mir A., O'Shaughnessy R., Mahoney M.G., Levy M., Montagutelli X., Ahmad W., Aita V.M., Gordon D., Uitto J., Whiting D., Ott J., Fischer S., Gilliam T.C., Jahoda C.A., Morris R.J., Panteleyev A.A., Nguyen V.T., Christiano A.M. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris // *Cell.*–2003.–V.113.–№2.–P.249–260.
166. Kobayashi K., Rochat A., Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–1993.–V.90.–P.7391–7395.
167. Koch P.J., Mahoney M.G., Cotsarelis G., Rothenberger K., Lavker R.M., Stanley J.R. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle // *J. Cell Sci.*–1998.–V.111.–P.2529–37.
168. Koch P.J., Mahoney M.G., Ishikawa H., Pulkkinen L., Uitto J., Shultz L., Murphy G.F., Whitaker-Menezes D., Stanley J.R. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris // *J. Cell Biol.*–1997.–V.137.–№5.–P.1091–1102.
169. Kollar E.J. The induction of hair follicles by embryonic dermal papillae // *J. Invest. Dermatol.*–1970.–V.55.–P.374–378.
170. Kopan R., Weintraub H. Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination // *J. Cell Biol.*–1993.–V.121.–P.631–641.
171. Koster M.I., Roop D.R. Mechanisms regulating epithelial stratification // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*–2007.–V.23.–P.93–113.
172. Kreidberg J.A., Donovan M.J., Goldstein S.L., Rennke H., Shepherd K., Jones R.C., Jaenisch R. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis // *Development.*–1996.–V.122.–№11.–P.3537–3547.

173. Kulesa H., Turk G., Hogan B.L. Inhibition of BMP signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle // *EMBO J.*–2000.–V.19.–P.6664–6674.
174. Kulukian A., Fuchs E. Spindle orientation and epidermal morphogenesis // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*–2013.–V.368.–№1629.–P.20130016.
175. Langbein L., Rogers M.A., Praetzel S., Winter H., Schweizer J. K6irs1, K6irs2, K6irs3, and K6irs4 represent the inner-root-sheath-specific type II epithelial keratins of the human hair follicle // *J. Invest. Dermatol.*–2003.–V.120.–№4.–P.512–522.
176. Langbein L., Rogers M.A., Winter H., Praetzel S., Schweizer J. The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins // *J. Biol. Chem.*–2001.–V.276.–№37.–P.35123–35132.
177. Lechler T., Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin // *Nature.*–2005.–V.437.–№7056.–P.275–280.
178. Lee D., Prowse D.M., Brissette J.L. Association between mouse nude gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation // *Dev. Biol.*–1999.–V.208.–№2.–P.362–374.
179. Lee J., Basak J.M., Demehri S., Kopan R. Bi-compartmental communication contributes to the opposite proliferative behavior of Notch1-deficient hair follicle and epidermal keratinocytes // *Development.*–2007.–V.134.–№ 15.–P.2795–2806.
180. Lee J., Tumbar T. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling // *Semin. Cell Dev. Biol.*–2012.–V.23.–№8.–P.906–916.
181. Lefevre P., Rochat A., Bodemer C., Vabres P., Barrandon Y., de Prost Y., Garner C., Hovnanian A. Linkage of Marie-Unna hypotrichosis locus to chromosome 8p21 and exclusion of 10 genes including the hairless gene by mutation analysis // *Eur. J. Hum. Genet.*–2000.–V.8.–№4.–P.273–279.
182. Lehman J.M., Laag E., Michaud E.J., Yoder B.K. An essential role for dermal primary cilia in hair follicle morphogenesis // *J. Invest. Dermatol.*–2009.–V.129.–№2.–P.438–448.
183. Levy L., Broad S., Diekmann D., Evans R.D., Watt F.M. Beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms// *Mol. Biol. Cell.*–2000.–V.11.–№2.–P.453–466.
184. Levy V., Lindon C., Harfe B.D., Morgan B.A. Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev. Cell.*–2005.–V.9.–№6.–P.855–861.
185. Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harfe B.D., Morgan B.A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding // *FASEB J.*–2007.–V.21.–№7.–P.1358–1366.
186. Levy-Nissenbaum E., Betz R.C., Frydman M., Simon M., Lahat H., Bakhan T., Goldman B., Bygum A., Pierick M., Hillmer A.M., Jonca N., Toribio J., Kruse R., Dewald G., Cichon S., Kubisch C., Guerrin M., Serre G., Nöthen M.M., Pras E. Hypotrichosis simplex of the

scalp is associated with nonsense mutations in CDSN encoding corneodesmosin // *Nature Genetics*.–2003.–V.34.–№2.–P.151–153.

187. Li J., Tzu J., Chen Y., Zhang Y.P., Nguyen N.T., Gao J., Bradley M., Keene D.R., Oro A.E., Miner J.H., Marinkovich M.P. Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis // *EMBO J*.–2003.–V.22.–№10.–P.2400–2410.

188. Li L., Mignone J., Yang M., Matic M., Penman S., Enikolopov G., Hoffman R.M. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.–2003.–V.100.–№17.–P.9958–9961.

189. Li L., Tennenbaum T., Yuspa S.H. Suspension-induced murine keratinocyte differentiation is mediated by calcium // *J. Invest. Dermatol.*–1996.–V.106.–№2.–P.254–260.

190. Lichti U., Yuspa S.H. Modulation of tissue and epidermal transglutaminases in mouse epidermal cells after treatment with TPA and/or retinoic acid in vivo and in culture // *Cancer Res*.–1988.–V.48.–P.74–81.

191. Lin M.H., Leimeister C., Gessler M., Kopan R. Activation of the Notch pathway in the hair cortex leads to aberrant differentiation of the adjacent hair-shaft layers // *Development*.–2000.–V.127.–№11.–P.2421–2432.

192. Lindner G., Menrad A., Gherardi E., Merlino G., Welker P., Handjiski B., Roloff B., Paus R. Involvement of hepatocyte growth factor scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling // *FASEB J*.–2000.–V.14.–№2.–P.319–332.

193. Liu X., Driskell R.R., Luo M., Abbott D., Filali M., Cheng N., Sigmund C.D., Engelhardt J.F. Characterization of Lef-1 promoter segments that facilitate inductive developmental expression in skin // *J. Invest. Dermatol.*–2004.–V.123.–№2.–P.264–274.

194. Lopez-Rovira T., Silva-Vargas V., Watt F.M. Different consequences of beta1 integrin deletion in neonatal and adult mouse epidermis reveal a context-dependent role of integrins in regulating proliferation, differentiation, and intercellular communication // *J. Invest. Dermatol.*–2005.–V.125.–№6.–P.1215–1227.

195. Ma L., Liu J., Wu T., Plikus M., Jiang T.X., Bi Q., Liu Y.H., Müller-Röver S., Peters H., Sundberg J.P., Maxson R., Maas R.L., Chuong C.M. 'Cyclic alopecia' in *Msx2* mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation // *Development*.–2003.–V.130.–№2.–P.379–389.

196. Magerl M., Tobin D.J., Müller-Röver S., Hagen E., Lindner G., McKay I.A., Paus R. Patterns of proliferation and apoptosis during murine hair follicle morphogenesis // *J. Invest. Dermatol.*–2001.–V.116.–№6.–P.947–955.

197. Mardaryev A.N., Gdula M.R., Yarker J.L., Emelianov V.N., Poterlowicz K., Sharov A.A., Sharova T.Y., Scarpa J.A., Chambon P., Botchkarev V.A., Fessing M.Y. p63 and Brg1 control developmentally regulated higher-order chromatin remodelling at the epidermal

differentiation complex locus in epidermal progenitor cells // *Development*.–2014.–V.141.–№1.–P.101–111.

198. Mardaryev A.N., Meier N., Poterlowicz K., Sharov A.A., Sharova T.Y., Ahmed M.I., Rapisarda V., Lewis C., Fessing M.Y., Ruenger T.M., Bhawan J., Werner S., Paus R., Botchkarev V.A. Lhx2 differentially regulates Sox9, Tcf4 and Lgr5 in hair follicle stem cells to promote epidermal regeneration after injury // *Development*.–2011.–V.138.–№22.–P.4843–4852.

199. Marinkovich M.P., Keene D.R., Rimberg C.S., Burgeson R.E. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane // *Dev. Dyn*.–1993.–V.197.–№4.–P.255–267.

200. Martinez-Mir A., Zlotogorski A., Gordon D., Petukhova L., Mo J., Gilliam T.C., Londono D., Haynes C., Ott J., Hordinsky M., Nanova K., Norris D., Price V., Duvic M., Christiano A.M. Genomewide scan for linkage reveals evidence of several susceptibility loci for alopecia areata // *Am. J. Hum. Genet*.–2007.–V.80.–№2.–P.316–328.

201. McCaffrey L.M., Macara I.G. Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*.–2009.–V.1.–№2.–a001370.

202. McElwee K.J., Kissling S., Wenzel E., Huth A., Hoffmann R. Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla // *J. Invest. Dermatol*.–2003.–V.121.–№6.–P.1267–1275.

203. McGrath J.A., McMillan J.R., Shemanko C.S., Runswick S.K., Leigh I.M., Lane E.B., Garrod D.R., Eady R.A. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia / skin fragility syndrome // *Nat. Genet*.–1997.–V.17.–P.240–244.

204. McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffery S., McKenna W.J. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) // *Lancet*.–2000.–V.355.–№9221.–P.2119–2124.

205. McNeill H. Planar cell polarity: keeping hairs straight is not so simple // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*.–2010.–V.2.–№2.–a003376.

206. Mecklenburg L., Nakamura M., Sundberg J.P., Paus R. The nude mouse skin phenotype: the role of Foxn1 in hair follicle development and cycling // *Exp. Mol. Pathol*.–2001.–V.71.–№2.–P.171–178.

207. Mecklenburg L., Tychsen B., Paus R. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype // *Exp. Dermatol*.–2005.–V.14.–№11.–P.797–810.

208. Meier N., Dear T.N., Boehm T. Foxn1 and mHa3 are components of the genetic hierarchy controlling hair follicle differentiation // *Mech. Dev*.–1999.–V.89.–P.215–221.

209. Michel M., Torok N., Godbout M.-J., Lussier M., Gaudreau P., Royal A., Germain L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing

cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage // *J. Cell Sci.*–1996.–V.109.–P.1017–1028.

210. Mill P., Mo R., Fu H., Grachtchouk M., Kim P.C., Dlugosz A.A., Hui C.C. Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development // *Genes Dev.*–2003.–V.17.–№2.–P.282–294.

211. Millar S.E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development // *J. Invest. Dermatol.*–2002.–V.118.–P.216–225.

212. Millar S.E., Willert K., Salinas P.C., Roelink H., Nusse R., Sussman D.J., Barsh G.S. Wnt signaling in the control of hair growth and structure // *Dev. Biol.*–1999.–V.207.–P.133–149.

213. Mills A.A., Zheng B., Wang X.J., Vogel H., Roop D.R., Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis // *Nature.*–1999.–V.398.–№6729.–P.708–713.

214. Mills V., Vincent C., Croute F., Serre G. The expression of desmosomal and corneodesmosomal antigen shows specific variations during the terminal differentiation of epidermal and hair follicle epithelia // *J. Histochem. Cytochem.*–1992.–V.40.–P.1329–1337.

215. Miner J.H., Li C., Mudd J.L., Go G., Sutherland A.E. Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation // *Development.*–2004.–V.131.–№10.–P.2247–2256.

216. Miner J.H., Yurchenco P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*–2004.–V.20.–P.255–284.

217. Miner J.H. Laminins and their roles in mammals // *Microsc. Res. Tech.*–2008.–V.71.–№5.–P.349–356.

218. Ming Kwan K., Li A.G., Wang X.J., Wurst W., Behringer R.R. Essential roles of BMPR-IA signaling in differentiation and growth of hair follicles and in skin tumorigenesis // *Genesis.*–2004.–V.39.–№1.–P.10–25.

219. Mobini N., Tam S., Kamino H. Possible role of the bulge region in the pathogenesis of inflammatory scarring alopecia: lichen planopilaris as the prototype // *J. Cutan. Pathol.*–2005.–V.32.–P.675–679.

220. Moll I., Kurzen H., Langbein L., Franke W.W. The distribution of the desmosomal protein, plakophilin 1, in human skin and skin tumors // *J. Invest. Dermatol.*–1997.–V.108.–№2.–P.139–146.

221. Monreal A.W., Ferguson B.M., Headon D.J., Street S.L., Overbeek P.A., Zonana J. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia // *Nat. Genet.*–1999.–V.22.–№4.–P.366–369.

222. Monreal A.W., Zonana J., Ferguson B. Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations // *Am. J. Hum. Genet.*–1998.–V.63.–№2.–P.380–389.
223. Montagutelli X., Hogan M.E., Aubin G., Lalouette A., Guénet J.L., King L.E. Jr., Sundberg J.P. Lanceolate hair (lah): a recessive mouse mutation with alopecia and abnormal hair // *J. Invest. Dermatol.*–1996.–V.107.–№1.–P.20–25.
224. Moriyama M., Durham A.D., Moriyama H., Hasegawa K., Nishikawa S., Radtke F., Osawa M. Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development // *Dev. Cell.*–2008.–V.14.–№4.–P.594–604.
225. Morris R.J., Liu Y., Marles L., Yang Z., Trempus C., Li S., Lin J.S., Sawicki J.A., Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells // *Nat. Biotechnol.*–2004.–V.22.–№4.–P.411–417.
226. Mou C., Jackson B., Schneider P., Overbeek P.A., Headon D.J. Generation of the primary hair follicle pattern // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–2006.–V.103.–№24.–P.9075–9080.
227. Muller-Rover S., Handjiski B., van der Veen C., Eichmüller S., Foitzik K., McKay I.A., Stenn K.S., Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages // *J. Invest. Dermatol.*–2001.–V.117.–№1.–P.3–15.
228. Müller-Röver S., Peters E.J., Botchkarev V.A., Panteleyev A., Paus R. Distinct Patterns of NCAM Expression Are Associated with Defined Stages of Murine Hair Follicle Morphogenesis and Regression // *J. Histochem. Cytochem.*–1998.–V.46.–№12.–P.1401–1410.
229. Mustonen T., Ilmonen M., Pummila M., Kangas A.T., Laurikkala J., Jaatinen R., Pispä J., Gaide O., Schneider P., Thesleff I., Mikkola M.L. Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages // *Development.*–2004.–V.131.–№20.–P.4907–4919.
230. Nahum S., Pasternack S.M., Pforr J., Indelman M., Wollnik B., Bergman R., Nöthen M.M., König A., Khamaysi Z., Betz R.C., Sprecher E. A large duplication in LIPH underlies autosomal recessive hypotrichosis simplex in four Middle Eastern families // *Arch. Dermatol. Res.*–2009.–V.301.–P.391–393.
231. Nakajima T., Inui S., Fushimi T., Noguchi F., Kitagawa Y., Reddy J.K., Itami S. Roles of MED1 in quiescence of hair follicle stem cells and maintenance of normal hair cycling // *J. Invest. Dermatol.*–2013.–V.133.–№2.–P.354–360.
232. Nakamura M., Sundberg J.P., Paus R. Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: annotated tables // *Experimental Dermatology.*–2001.–V.10.–№6.–P.369–390.

233. Nehls M., Pfeifer D., Schorpp M., Hedrich H., Boehm T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations // *Nature*.–1994.–V.372.–P.103–107.
234. Nelson W.J. Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity // *Cold Spring Harb Perspect Biol*.–2009.–V.1.–№1.–a000513
235. Nguyen H., Rendl M., Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin // *Cell*.–2006.–V.127.–P.171–183.
236. Nickoloff B.J., Qin J.Z., Chaturvedi V., Denning M.F., Bonish B., Miele L. Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma // *Cell Death Differ*.–2002.–V.9.–№8.–P.842–855.
237. Norgett E.E., Hatsell S.J., Carvajal-Huerta L., Cabezas J.C., Common J., Purkis P.E., Whittcock N., Leigh I.M., Stevens H.P., Kelsell D.P. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma // *Hum. Mol. Genet*.–2000.–V.9.–№18.–P.2761–2766.
238. Nowak J.A., Polak L., Pasolli H.A., Fuchs E. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis // *Cell Stem Cell*.–2008.–V.3.–№1.–P.33–43.
239. O’Keefe E.J., Hamilton E.H., Lee S.C., Steinert P. Trichohyalin: a structural protein of hair, tongue, nail, and epidermis // *J. Invest. Dermatol*.–1993.–V.101.–P.65S–71S.
240. Ohuchi H., Tao H., Ohata K., Itoh N., Kato S., Noji S., Ono K. Fibroblast growth factor 10 is required for proper development of the mouse whiskers // *Biochem. Biophys. Res. Commun*.–2003.–V.302.–№3.–P.562–567.
241. Ohyama M., Terunuma A., Tock C.L., Radonovich M.F., Pise-Masison C.A., Hopping S.B., Brady J.N., Udey M.C., Vogel J.C. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells // *J. Clin. Invest*.–2006.–V.116.–№1.–P.249–260.
242. Oliver R.F. The experimental induction of whisker growth in the hooded rat by implantation of dermal papillae // *J. Embryol. Exp. Morphol*.–1967.–V.18.–P.43–51.
243. Oliver R.F. The induction of hair follicle formation in the adult hooded rat by vibrissa dermal papillae // *J. Embryol. Exp. Morphol*.–1970.–V.23.–P.219–236.
244. Oro A.E., Scott M.P. Splitting hairs: dissecting roles of signaling systems in epidermal development // *Cell*.–1998.–V.95.–№5.–P.575–578.
245. Ortiz-Urda S., Garcia J., Green C.L., Chen L., Lin Q., Veitch D.P., Sakai L.Y., Lee H., Marinkovich M.P., Khavari P.A. Type VII collagen is required for Ras-driven human epidermal tumorigenesis // *Science*.–2005.–V.307.–№5716.–P.1773–1776.
246. Oshima H., Rochat A., Kedzia C., Kobayashi K., Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*.–2001.–V.104.–P.233–245.

247. Palmer E.L., Ruegg C., Ferrando R., Pytela R., Sheppard D. Sequence and tissue distribution of the integrin alpha 9 subunit, a novel partner of beta 1 that is widely distributed in epithelia and muscle // *J. Cell Biol.*–1993.–V.123.–P.1289–1297.
248. Pan Y., Lin M.H., Tian X., Cheng H.T., Gridley T., Shen J., Kopan R. Gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis // *Dev. Cell.*–2004.–V.7.–№5.–P.731–743.
249. Panteleyev A.A., Botchkareva N.V., Sundberg J.P., Christiano A.M., Paus R. The role of the hairless (hr) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation // *Am. J. Pathol.*–1999.–V.155.–№1.–P.159–171.
250. Panteleyev A.A., Jahoda C.A., Christiano A.M. Hair follicle predetermination // *J. Cell Sci.*–2001.–V.114.–P.419–431.
251. Paus R., Cotsarelis G. The biology of hair follicles // *N. Engl. J. Med.*–1999.–V.341.–P.491–497.
252. Paus R., Foitzik K., Welker P., Bulfone-Paus S., Eichmüller S. Transforming growth factor-beta receptor type I and type II expression during murine hair follicle development and cycling // *J. Invest. Dermatol.*–1997.–V.109.–№4.–P.518–526
253. Paus R., Nickoloff B.J., Ito T. A ‘hairy’ privilege // *Trends Immunol.*–2005.–V.26.–№1.–P.32–40.
254. Paus R., Müller-Röver S., Van Der Veen C., Maurer M., Eichmüller S., Ling G., Hofmann U., Foitzik K., Mecklenburg L., Handjiski B. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis // *J. Invest. Dermatol.*–1999.–V.113.–№4.–P.523–532.
255. Payne A.S. No evidence of skin blisters with human desmocollin-3 gene mutation. *Am. J. Hum. Genet.*–2010.–V.86.–P.292.
256. Peters T., Sedlmeier R., Büsow H., Runkel F., Lüers G.H., Korthaus D., Fuchs H., Hrabé de Angelis M., Stumm G., Russ A.P., Porter R.M., Augustin M., Franz T. Alopecia in a novel mouse model RCO3 is caused by mK6irs1 deficiency // *J. Invest. Dermatol.*–2003.–V.121.–№4.–P.674–680.
257. Petiot A., Conti F.J., Grose R., Revest J.M., Hodivala-Dilke K.M., Dickson C. A crucial role for Fgfr2-IIIb signalling in epidermal development and hair follicle patterning // *Development.*–2003.–V.130.–№22.–P.5493–5501.
258. Petukhova L., Sousa Jr E.C., Martinez-Mir A., Vitebsky A., Dos Santos L.G., Shapiro L., Haynes C., Gordon D., Shimomura Y., Christiano A.M. Genome-wide linkage analysis of an autosomal recessive hypotrichosis identifies a novel P2RY5 mutation // *Genomics.*–2008.–V.92.–P.273–278.

259. Plikus M., Wang W.P., Liu J., Wang X., Jiang T.X., Chuong C.M. Morpho-regulation of ectodermal organs: integument pathology and phenotypic variations in K14-Noggin engineered mice through modulation of bone morphogenic protein pathway // *Am. J. Pathol.*–2004.–V.164.–№3.–P.1099–1114.
260. Plikus M.V., Gay D.L., Treffeisen E., Wang A., Supapannachart R.J., Cotsarelis G. Epithelial stem cells and implications for wound repair // *Semin. Cell Dev. Biol.*–2012.–V.23.–№9.–P.946–953.
261. Pöschl E., Schlötzer-Schrehardt U., Brachvogel B., Saito K., Ninomiya Y., Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development // *Development.*–2004.–V.131.–№7.–P.1619–1628.
262. Potts W., Bowyer J., Jones H., Tucker D., Freemont A.J., Millett A., Martin C., Vernon W., Neerunjun D., Slyn G., Harper F., Maciewicz R. Cathepsin L-deficient mice exhibit abnormal skin and bone development and show increased resistance to osteoporosis following ovariectomy // *Int. J. Exp. Pathol.*–2004.–V.85.–№2.–P.85–96.
263. Poulson N.D., Lechler T. Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis // *J. Cell Biol.*–2010.–V.191.–№5.–P.915–922.
264. Powell B.C., Nesci A., Rogers G.E. Regulation of keratin gene expression in hair follicle differentiation // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*–1991.–V.642.–P.1–20.
265. Prowse D.M., Lee D., Weiner L., Jiang N., Magro C.M., Baden H.P., Brissette J.L. Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia // *Dev. Biol.*–1999.–V.212.–№1.–P.54–67.
266. Pulkkinen L., Choi Y.W., Simpson A., Montagutelli X., Sundberg J., Uitto J., Mahoney M.G. Loss of cell adhesion in Dsg3bal-Pas mice with homozygous deletion mutation (2079del14) in the desmoglein 3 gene // *J. Invest. Dermatol.*–2002.–V.119.–№6.–P.1237–1243.
267. Pummila M., Fliniaux I., Jaatinen R., James M.J., Laurikkala J., Schneider P., Thesleff I., Mikkola M.L. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression // *Development.*–2007.–V.134.–№1.–P.117–125.
268. Raghavan S., Bauer C., Mundschauf G., Li Q., Fuchs E. Conditional ablation of beta1 integrin in skin. Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation, and hair follicle invagination // *J. Cell Biol.*–2000.–V.150.–№5.–P.1149–1160.
269. Rangarajan A., Talora C., Okuyama R., Nicolas M., Mammucari C., Oh H., Aster J.C., Krishna S., Metzger D., Chambon P., Miele L., Aguet M., Radtke F., Dotto G.P. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation // *EMBO J.*–2001.–V.20.–№13.–P.3427–3436.

270. Ray S., Lechler T. Regulation of asymmetric cell division in the epidermis // *Cell Div.*–2011.–V.6.–№1.–P.12.
271. Reddy S., Andl T., Bagasra A., Lu M., Epstein D., Morrissey E., Millar S.E. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis // *Mech. Dev.*–2001.–V.107.–P.1–14.
272. Rhee H., Polak L., Fuchs E. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles // *Science.*–2006.–V.312.–№5782.–P.1946–1949.
273. Richardson G.D., Bazzi H., Fantauzzo K.A., Waters J.M., Crawford H., Hynd P., Christiano A.M., Jahoda C.A. KGF and EGF signalling block hair follicle induction and promote interfollicular epidermal fate in developing mouse skin // *Development.*–2009.–V.136.–№13.–P.2153–2164.
274. Richardson G.D., Fantauzzo K.A., Bazzi H., Määttä A., Jahoda C.A. Dynamic expression of Syndecan-1 during hair follicle morphogenesis // *Gene Expr. Patterns.*–2009.–V.9.–№6.–P.454–460.
275. Ries A., Gohring W., Fox J., Timpl R., Sasaki T. Recombinant domains of mouse nidogen-1 and their binding to basement membrane proteins and monoclonal antibodies // *Eur. J. Biochem.*–2001.–V.268.–№19.–P.5119–5128.
276. Rogers G.E., Powell B.C. Organization and expression of hair follicle genes // *J. Invest. Dermatol.*–1993.–V.101.–P.50S–55S.
277. Roth W., Deussing J., Botchkarev V.A., Pauly-Evers M., Saftig P., Hafner A., Schmidt P., Schmahl W., Scherer J., Anton-Lamprecht I., Von Figura K., Paus R., Peters C. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling // *FASEB J.*–2000.–V.14.–№13.–P.2075–2086.
278. Ruiz P., Brinkmann V., Ledermann B., Behrend M., Grund C., Thalhammer C., Vogel F., Birchmeier C., Günthert U., Franke W.W., Birchmeier W. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart // *J. Cell Biol.*–1996.–V.135.–№1.–P.215–225.
279. Schaffer J.V., Bazzi H., Vitebsky A., Witkiewicz A., Kovich O.I., Kamino H., Shapiro L.S., Amin S.P., Orlow S.J., Christiano A.M. Mutations in the desmoglein 4 gene underlie localized autosomal recessive hypotrichosis with monilethrix hairs and congenital scalp erosions // *J. Invest. Dermatol.*–2006.–V.126.–№6.–P.1286–1291.
280. Schlake T., Schorpp M., Maul-Pavicic A., Malashenko A.M., Boehm T. Forkhead/winged-helix transcription factor Whn regulates hair keratin gene expression: molecular analysis of the nude skin phenotype // *Dev. Dyn.*–2000.–V.217.–P.368–376.

281. Schlake T. Determination of hair structure and shape // *Semin. Cell Dev. Biol.*–2007.–V.18.–№2.–P.267–273.
282. Schmidt-Ullrich R., Aebischer T., Hulsken J., Birchmeier W., Klemm U., Huelsken J. Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices // *Development.*–2001.–V.128.–P.3843–3853.
283. Schmidt-Ullrich R., Tobin D.J., Lenhard D., Schneider P., Paus R., Scheidereit C. NF-kappaB transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth // *Development.*–2006.–V.133.–P.1045–1057.
284. Schmidt-Ullrich R., Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis // *Bioessays.*–2005.–V.27.–№3.–P.247–261.
285. Schneider M.R., Schmidt-Ullrich R., Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan // *Curr. Biol.*–2009.–V.19.–№3.–P.132–142.
286. Schorpp M., Schlake T., Kreamalmeyer D., Allen P. M., Boehm T. Genetically separable determinants of hair keratin gene expression // *Dev. Dyn.*–2000.–V.218.–P.537–543.
287. Sennett R., Rendl M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling // *Semin. Cell Dev. Biol.*–2012.–V.23.–№8.–P.917–927.
288. Shimomura Y., Agalliu D., Vonica A., Luria V., Wajid M., Baumer A., Belli S., Petukhova L., Schinzel A., Brivanlou A.H., Barres B.A., Christiano A.M. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex // *Nature.*–2010a.–V.464.–P.1043–1047.
289. Shimomura Y., Christiano A.M. Biology and genetics of hair // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*–2010.–V.11.–P.109–132.
290. Shimomura Y., Sakamoto F., Kariya N., Matsunaga K., Ito M. Mutations in the desmoglein 4 gene are associated with monilethrix-like congenital hypotrichosis // *J. Invest. Dermatol.*–2006.–V.126.–№6.–P.1281–1285.
291. Shimomura Y., Wajid M., Ishii Y., Shapiro L., Petukhova L., Gordon D., Christiano A.M. Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair // *Nat. Genet.*–2008a.–V.40.–№3.–P.335–339.
292. Shimomura Y., Wajid M., Petukhova L., Shapiro L., Christiano A.M. Mutations in the lipase H gene underlie autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis // *J. Invest. Dermatol.*–2009.–V.129.–№3.–P.622–628.
293. Shimomura Y., Wajid M., Petukhova L., Kurban M., Christiano A.M. Autosomal dominant woolly hair resulting from disruption of keratin 74 (KRT74), a potential determinant of human hair texture // *Am. J. Hum. Genet.*–2010.–V.86.–P.632–638.

294. Shimomura Y., Wajid M., Shapiro L., Christiano A.M. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle // *Development*.—2008.—V.135.—№4.—P.743–753.
295. Shimomura Y. Congenital hair loss disorders: rare, but not too rare // *J. Dermatol.*—2012.—V.39.—№1.—P.3–10.
296. Sick S., Reinker S., Timmer J., Schlake T. WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism // *Science*.—2006.—V.314.—№5804.—P.1447–1450.
297. Simon M., Jonca N., Guerrin M., Haftek M., Bernard D., Caubet C., Egelrud T., Schmidt R., Serre G. Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation // *J. Biol. Chem.*—2001.—V.276.—№23.—P.20292–20299.
298. Simons M., Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease // *Annu. Rev. Genet.*—2008.—V.42.—P.517–540.
299. Simpson M.A., Mansour S., Ahnood D., Kalidas K., Patton M.A., McKenna W.J., Behr E.R., Crosby A.H. Homozygous mutation of desmocollin-2 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with mild palmoplantar keratoderma and woolly hair // *Cardiology*.—2009.—V.113.—№1.—P.28–34.
300. Smyth N., Vatansever H.S., Murray P., Meyer M., Frie C., Paulsson M., Edgar D. Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation // *J. Cell Biol.*—1999.—V.144.—№1.—P.151–160.
301. Snippert H.J., Haegebarth A., Kasper M., Jaks V., van Es J.H., Barker N., van de Wetering M., van den Born M., Begthel H., Vries R.G., Stange D.E., Toftgard R., Clevers H. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin // *Science*.—2010.—V.327.—№5971.—P.1385–1389.
302. Sorokina J.D., Blandova Z.K. Waved alopecia // *Mouse News Lett.*—1985.—V.73.—P.23.
303. South A.P., Wan H., Stone M.G., Dopping-Hepenstal P.J., Purkis P.E., Marshall J.F., Leigh I.M., Eady R.A., Hart I.R., McGrath J.A. Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability // *J. Cell Sci.*—2003.—V.116.—P.3303–3314.
304. Sprecher E., Bergman R., Richard G., Lurie R., Shalev S., Petronius D., Shalata A., Anbinder Y., Leibur R., Perlman I., Cohen N., Szargel R. Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin // *Nat. Genet.*—2001.—V.29.—№2.—P.134–136.
305. Sreekumar G.P., Roberts J.L., Wong C.Q., Stenn K.S., Parimoo S. MarieUnna hereditary hypotrichosis gene maps to human chromosome 8p21 near hairless // *J. Invest. Dermatol.*—2000.—V.114.—№3.—P.595–597.

306. Srivastava A.K., Durmowicz M.C., Hartung A.J., Hudson J., Ouzts L.V., Donovan D.M., Cui C.Y., Schlessinger D. Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice // *Hum. Mol. Genet.*—2001.—V.10.—№26.—P.2973–2981.
307. Srivastava A.K., Pispá J., Hartung A.J., DuY., Ezer S., Jenks T., Shimada T., Pekkanen M., Mikkola M.L., Ko M.S., Thesleff I., Kere J., Schlessinger D. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*—1997.—V.94.—№24.—P.13069–13074.
308. St Johnston D., Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity // *Cell.*—2010.—V.141.—№5.—P.757–774.
309. Steinert P.M., Parry D.A., Marekov L.N. Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath // *J. Biol. Chem.*—2003.—V.278.—№42.—P.41409–41419.
310. Stenn K.S., Paus R. Controls of hair follicle cycling. // *Physiol. Rev.*—2001.—V.81.—№1.—P.449–494.
311. Stephens L.E., Sutherland A.E., Klimanskaya I.V., Andrieux A., Meneses J., Pedersen R.A., Damsky C.H. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality // *Genes Dev.*—1995.—V.9.—P.1883–1895.
312. Stepp M.A. Alpha9 and beta8 integrin expression correlates with the merger of the developing mouse eyelids // *Dev. Dyn.*—1999.—V.214.—№3.—P.216–228.
313. Stern C.D. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions // *Development.*—2005.—V.132.—№9.—P.2007–2021.
314. St-Jacques B., Dassule H.R., Karavanova I., Botchkarev V.A., Li J., Danielian P.S., McMahon J.A., Lewis P.M., Paus R., McMahon A.P. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development // *Curr. Biol.*—1998.—V.8.—№19.—P.1058–1068.
315. Sugawara K., Tsuruta D., Kobayashi H., Ikeda K., Hopkinson S.B., Jones J.C., Ishii M. Spatial and temporal control of laminin-332 (5) and -511 (10) expression during induction of anagen hair growth // *J. Histochem. Cytochem.*—2007.—V.55.—№1.—P.43–55.
316. Sundberg J.P., Shultz L.D., King L.E., Montagutelli X. The spontaneous balding and desmoglein 3 null mutations: mouse models for pemphigus vulgaris // *JAX Notes.*—1998.—V.473.
317. Sundberg J.P., King L.E. Jr. Mouse mutations as animal models and biomedical tools for dermatological research // *J. Invest. Dermatol.*—1996.—V.106.—№2.—P.368–376.
318. Sundberg J.P., Rourk M.H., Boggess D., Hogan M.E., Sundberg B.A., Bertolino A.P. Angora mouse mutation: altered hair cycle, follicular dystrophy, phenotypic maintenance of skin grafts, and changes in keratin expression // *Vet. Pathol.*—1997.—V.34.—P.171–179.

319. Sundberg J.P., Silva K.A., Li R., Cox G.A., King L.E. Adult-onset alopecia areata is a complex polygenic trait in the C3H/HeJ mouse model // *J. Invest. Derm.*–2004.–V.123.–P.294–297
320. Takagi J., Yang Y., Liu J.H., Wang J.H., Springer T.A. Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic beta-propeller interface // *Nature*.–2003.–V.424.–№6951.–P.969–974.
321. Takahashi T., Kamimura A., Hamazono-Matsuoka T., Honda S. Phosphatidic acid has a potential to promote hair growth in vitro and in vivo, and activates mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hair epithelial cells // *J. Invest. Dermatol.*–2003.–V.121.–№3.–P.448–456.
322. Tarcsa E., Marekov L.N., Andreoli J., Idler W.W., Candi E., Chung S.I., Steinert P.M. The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases // *J. Biol. Chem.*–1997.–V.272.–№44.–P.27893–27901.
323. Taylor G., Lehrer M.S., Jensen P.J., Sun T.T., Lavker R.M. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis // *Cell*.–2000.–V.102.–P.451–461.
324. Tersikh V.V., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A. Label retaining cells and cutaneous stem cells // *Stem Cell Rev.*–2012.–V.8.–№2.–P.414–425.
325. Thacher S.M., Rice R.H. Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation // *Cell*.–1985.–V.40.–№3.–P.685–695.
326. Tobin D.J., Foitzik K., Reinheckel T., Mecklenburg L., Botchkarev V.A., Peters C., Paus R. The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling // *Am. J. Pathol.*–2002.–V.160.–№5.–P.1807–1821.
327. Toribio J., Quinones P.A. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp. Evidence for autosomal dominant inheritance // *Brit. J. Derm.*–1974.–V.91.–P.687–696.
328. Trempus C.S., Morris R.J., Bortner C.D., Cotsarelis G., Faircloth R.S., Reece J.M., Tennant R.W. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34 // *J. Invest. Dermatol.*–2003.–V.120.–№4.–P.501–511.
329. Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W.E., Rendl M., Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin // *Science*.–2004.–V.303.–P.359–363.
330. Turing A. The Chemical Basis of Morphogenesis // *Philos. Trans. R. Soc. London B*.–1952.–V.237.–№641.–P.37–72.
331. Uyttendaele H., Panteleyev A.A., de Berker D., Tobin D.T., Christiano A.M. Activation of Notch1 in the hair follicle leads to cell-fate switch and Mohawk alopecia // *Differentiation*.–2004.–V.72.–№8.–P.396–409.

332. van der Neut R., Krimpenfort P., Calafat J., Niessen C.M., Sonnenberg A. Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice // *Nat. Genet.*–1996.–V.13.–№3.–P.366–369.
333. van Genderen C., Okamura R.M., Farinas I., Quo R.G., Parslow T.G., Bruhn L., Grosschedl R. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice // *Genes Dev.*–1994.–V.8.–№22.–P.2691–2703.
334. van Steensel M., Smith F.J., Steijlen P.M., Kluijt I., Stevens H.P., Messenger A., Kremer H., Dunnill M.G., Kennedy C., Munro C.S., Doherty V.R., McGrath J.A., Covello S.P., Coleman C.M., Uitto J., McLean W.H. The gene for hypotrichosis of Marie Unna maps between D8S258 and D8S298: exclusion of the hr gene by cDNA and genomic sequencing // *Am. J. Hum. Genet.*–1999.–V.65.–№2.–P.413–419.
335. van Steensel M.A., Steijlen P.M., Bladergroen R.S., Vermeer M., van Geel M. A missense mutation in the type II hair keratin hHb3 is associated with monilethrix // *J. Med. Genet.*–2005.–V.42.–№3.–e19.
336. Van Raamsdonk C.D. Hereditary hair loss and the ancient signaling pathways that regulate ectodermal appendage formation // *Clin. Genet.*–2009.–V.76.–№4.–P.332–340.
337. Vasioukhin V., Bowers E., Bauer C., Degenstein L., Fuchs E. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation // *Nat. Cell Biol.*–2001.–V.3.–P.1076–1085.
338. Vauclair S., Nicolas M., Barrandon Y., Radtke F. Notch1 is essential for postnatal hair follicle development and homeostasis // *Dev. Biol.*–2005.–V.284.–№1.–P.184–193.
339. Vorotelyak E.A., Terskikh V.V., Vasiliev A.V. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Epidermal Keratinocytes. In: *Keratinocytes: Structure, Molecular Mechanisms and Role in Immunity* // Ed. E. Ranzato Nova Science Publishers.–2013. ISBN: 978-1-62618-798-6.–P.69–108.
340. Wang Y., Nathans J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions // *Development.*–2007.–V.134.–№4.–P.647–658.
341. Wapinski O., Chang H.Y. Long noncoding RNAs and human disease // *Trends Cell Biol.*–2011.–V.21.–№6.–P.354–361.
342. Watt F.M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation // *EMBO J.*–2002.–V.21.–№15.–P.3919–3926.
343. Watt F.M., Fujiwara H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*–2011.–V.3.–№4.–a005124.
344. Watt F.M., Green H. Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures // *J. Cell Biol.*–1981.–V.90.–№3.–P.738–742.

345. Watt FM. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.*–1983.–V.81.–P.100s–3s.
346. Watt F.M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation // *EMBO J.*–2002.–V.21.–№15.–P.3919–3926.
347. Wedlich D. The polarising role of cell adhesion molecules in early development // *Curr. Opin. Cell Biol.*–2002.–V.14.–№5.–P.563–568.
348. Wen Y., Liu Y., Xu Y., Zhao Y., Hua R., Wang K., Sun M., Li Y., Yang S., Zhang X.J., Kruse R., Cichon S., Betz R.C., Nöthen M.M., van Steensel M.A., van Geel M., Steijlen P.M., Hohl D., Huber M., Dunnill G.S., Kennedy C., Messenger A., Munro C.S., Terrinoni A., Hovnanian A., Bodemer C., de Prost Y., Paller A.S., Irvine A.D., Sinclair R., Green J., Shang D., Liu Q., Luo Y., Jiang L., Chen H.D., Lo W.H., McLean W.H., He C.D., Zhang X. Loss-of-function mutations of an inhibitory upstream ORF in the human hairless transcript cause Marie Unna hereditary hypotrichosis // *Nat. Genet.*–2009.–V.41.–№2.–P.228–233.
349. Whitelock J.M., Melrose J., Iozzo R.V. Diverse cell signaling events modulated by perlecan // *Biochemistry.*–2008.–V.47.–№43.–P.11174–11183.
350. Whiting D.A. Histopathologic features of alopecia areata: a new look // *Arch. Dermatol.*–2003.–V.139.–P.1555–1559.
351. Winter H., Rogers M.A., Langbein L., Stevens H.P., Leigh I.M., Labrèze C., Roul S., Taieb A., Krieg T., Schweizer J. Mutations in the hair cortex keratin hHb6 cause the inherited hair disease monilethrix // *Nat. Genet.*–1997.–V.16.–№4.–P.372–374.
352. Wong L.L., Adler P.N. Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells // *J. Cell Biol.*–1993.–V.123.–№1.–P.209–221.
353. Wong V.W., Gurtner G.C., Longaker M.T. Wound healing: a paradigm for regeneration // *Mayo. Clin Proc.*–2013.–V.88.–№9.–P.1022–1031.
354. Woo W.M., Zhen H.H., Oro A.E. Shh maintains dermal papilla identity and hair morphogenesis via a Noggin-Shh regulatory loop // *Genes Dev.*–2012.–V.26.–№11.–P.1235–1246.
355. Xavier S.P., Gordon-Thomson C., Wynn P.C., McCullagh P., Thomson P.C., Tomkins L., Mason R.S., Moore G.P. Evidence that Notch and Delta expressions have a role in dermal condensate aggregation during wool follicle initiation // *Exp. Dermatol.*–2013.–V.22.–№10.–P.659–662.
356. Yamamoto N., Tanigaki K., Han H., Hiai H., Honjo T. Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicular stem cells // *Curr. Biol.*–2003.–V.13.–№4.–P.333–338.

357. Yanagida K., Masago K., Nakanishi H., Kihara Y., Hamano F., Tajima Y., Taguchi R., Shimizu T., Ishii S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6 // *J. Biol. Chem.*—2009.—V.284.—№26.—P.17731–17741.
358. Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C., McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development // *Nature*.—1999.—V.398.—№6729.—P.714–718.
359. Yang J., Meyer M., Muller A.K., Bohm F., Grose R., Dauwalder T., Verrey F., Kopf M., Partanen J., Bloch W., Ornitz D.M., Werner S. Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis // *J. Cell Biol.*—2010.—V.188.—№6.—P.935–952.
360. Yi R., O'Carroll D., Pasolli H.A., Zhang Z., Dietrich F.S., Tarakhovsky A., Fuchs E. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs // *Nat. Genet.*—2006.—V.38.—№3.—P.356–362.
361. Yurchenco P.D., Furthmayr H. Self assembly of basement membrane collagen // *Biochemistry*.—1984.—V.23.—№8.—P.1839–1850.
362. Yurchenco P.D., Schittny J.C. Molecular architecture of basement membranes // *FASEB J.*—1990.—V.4.—№6.—P.1577–1590.
363. Yurchenco P.D., Smirnov S., Mathus T. Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins // *Methods Cell Biol.*—2002.—V.69.—P.111–144.
364. Yuspa S.H., Kilkenny A.E., Steinert P.M., Roop D.R. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro // *J. Cell Biol.*—1989.—V.109.—№3.—P.1207–1217.
365. Yuspa S.H., Ben T., Steinert P. Retinoic acid induces transglutaminase activity, but inhibits cornification of cultured epidermal cells // *J. Biol. Chem.*—1982.—V.257.—P.9906–9908.
366. Yuspa S.H., Lichti U., Ben T., Hennings H. Modulation of terminal differentiation and responses to tumor promoters by retinoids in mouse epidermal cell cultures // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*—1981.—V.359.—P.260–274.
367. Zhang Y., Andl T., Yang S.H., Teta M., Liu F., Seykora J.T., Tobias J.W., Piccolo S., Schmidt-Ullrich R., Nagy A., Taketo M.M., Dlugosz A.A., Millar S.E. Activation of beta-catenin signaling programs embryonic epidermis to hair follicle fate // *Development*.—2008.—V.135.—№12.—P.2161–2172.
368. Zhang Y., Tomann P., Andl T., Gallant N.M., Huelsken J., Jerchow B., Birchmeier W., Paus R., Piccolo S., Mikkola M.L., Morrissey E.E., Overbeek P.A., Scheidereit C., Millar S.E.,

Schmidt-Ullrich R. Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NF-kappaB and Wnt/beta-catenin signaling pathways in hair follicle induction // *Dev. Cell.*–2009.–V.17.–№1.–P.49–61.

369. Zhang H., Pasolli H.A., Fuchs E. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–2011.–V.108.–№6.–P.2270–2275.

370. Zhou P., Byrne C., Jacobs J., Fuchs E. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate // *Genes Dev.*–1995.–V.9.–№6.–P.700–713.

371. Zlotogorski A., Marek D., Horev L., Abu A., Ben-Amitai D., Gerad L., Ingber A., Frydman M., Reznik-Wolf H., Vardy D.A., Pras E. An autosomal recessive form of monilethrix is caused by mutations in DSG4: clinical overlap with localized autosomal recessive hypotrichosis // *J. Invest. Dermatol.*–2006.–V.126.–№6.–P.1292–1296.